

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
ИМЕНИ М.В.ЛОМОНОСОВА  
ФАКУЛЬТЕТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ЦЕНТР КАРДИОЛОГИИ МЗ РФ

*На правах рукописи*

Стафеев Юрий Сергеевич

ВОЗДЕЙСТВИЕ НА ВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ СТАТУС АДИПОЦИТОВ КАК ПОДХОД К  
РЕГУЛЯЦИИ ИХ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К ИНСУЛИНУ

03.01.04 – Биохимия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор Парфёнова Е.В.

Научный консультант:

доктор биологических наук, Меньшиков М.Ю.

Москва – 2019

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b> .....	6
<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	9
<b>1.ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	19
1.1.Инсулиновая сигнализация и ее регуляция.....	19
1.1.1.Физиологическое состояние инсулиновой сигнализации.....	20
1.1.2.Обратные связи и регуляция инсулиновой сигнализации.....	26
1.2.Ассоциация ожирения и латентного воспаления жировой ткани.....	28
1.2.1.Пусковые механизмы развития воспаления при ожирении.....	28
1.2.2.Изменения иммунофенотипа жировой ткани при ожирении.....	32
1.2.3.Ожирение и МСК ЖТ.....	35
1.3.ИЛ-4 как перспективный терапевтический агент для коррекции инсулиновой резистентности жировой ткани.....	36
1.3.1.ИЛ-4: сигнализация и физиологические эффекты.....	38
1.3.2.ИЛ-4 и жировая ткань.....	39
1.4.Генная терапия.....	40
1.4.1.Плазмидная генная терапия.....	42
1.4.2.Вирусная генная терапия.....	44
1.5.Заключение.....	46
<b>2.МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ</b> .....	47
2.1.Клиническая характеристика пациентов, включенных в исследование....	47
2.2.Иммуногистохимическое исследование биоптатов жировой ткани пациентов.....	49
2.3.Выделение МСК из жировой ткани пациентов.....	51
2.4.Культивирование, заморозка и адипогенная дифференцировка МСК ЖТ пациентов.....	52
2.5.Оценка пролиферации МСК ЖТ пациентов.....	54
2.6.Оценка распределения по фазам клеточного цикла МСК ЖТ пациентов..	54
2.7.Выделение фракции тотальной РНК из клеток.....	55

2.8.Проведение количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени.....	56
2.9.Оценка адипогенной дифференцировки МСК ЖТ пациентов.....	57
2.10.Культивирование преадипоцитов мышцы 3Т3-L1 и их адипоцитарная дифференцировка.....	58
2.11.Моделирование метаболического стресса на зрелых адипоцитах 3Т3-L1.....	59
2.12.Коррекция воспалительного статуса и инсулиновой чувствительности адипоцитов с помощью рекомбинантного ИЛ-4.....	61
2.13.Создание лентивирусной конструкции, кодирующей ИЛ-4.....	61
2.14.Лентивирусная трансдукция зрелых адипоцитов и контроль наработки трансгена.....	63
2.15.Оценка инсулин-индуцируемого захвата радиоактивных аналогов [ <sup>3</sup> H]-2-дезоксиглюкозы.....	64
2.16.Иммуноблоттинг.....	65
2.17.Иммуноцитохимическое исследование ядерной транслокации транскрипционного фактора STAT6.....	65
2.18.Анализ изменения протеома зрелых адипоцитов 3Т3-L1 при кратком и длительном действии ИЛ-4.....	67
2.19. Статистический анализ.....	68
<b>3.РЕЗУЛЬТАТЫ.....</b>	<b>70</b>
3.1.Клиническая характеристика пациентов, включенных в исследование....	70
3.2.Подкожная и сальниковая жировые ткани пациентов с ожирением и СД2Т имеют в своем составе гипертрофированные адипоциты.....	71
3.3.Подкожная и сальниковая жировые ткани пациентов с ожирением и СД2Т имеют высокую степень инфильтрации CD68-позитивными клетками.....	72
3.4.Подкожная и сальниковая жировые ткани пациентов с ожирением и СД2Т не имеют статистически значимых различий по числу макрофагов, экспрессирующих CCR7.....	74

3.5.Подкожная и сальниковая жировые ткани пациентов с ожирением и СД2Т имеют сниженное количество макрофагов, экспрессирующих CD206.....	76
3.6.МСК подкожной жировой ткани пациентов с СД2Т имеют ухудшенную динамику пролиферативной активности по сравнению с МСК подкожной жировой ткани пациентов с НГТ с 24 до 96 часов наблюдения.....	78
3.7.МСК сальниковой жировой ткани пациентов с СД2Т имеют ухудшенную динамику пролиферативной активности по сравнению с МСК сальниковой жировой ткани пациентов с НГТ на 72 и 96 часах наблюдения.....	78
3.8.Активность стресс-активируемой киназы JNK повышена в адипоцитах, полученных из МСК ЖТ пациентов с СД2Т.....	80
3.9.МСК ЖТ пациентов с СД2Т имеют пониженную способность к адипогенной дифференцировке по сравнению с МСК ЖТ пациентов с НГТ.....	81
3.10.Влияние агентов, индуцирующих метаболический стресс, на инсулиновую чувствительность и воспалительный статус зрелых адипоцитов.....	85
3.11.Обработка инсулинорезистентных зрелых адипоцитов 3Т3-L1 рекомбинантным ИЛ-4 в концентрации 50 нг/мл восстанавливает инсулиновую чувствительность зрелых адипоцитов.....	88
3.12.Обработка дифференцирующихся преадипоцитов 3Т3-L1 не влияет на эффективность адипоцитарной дифференцировки.....	95
3.13.Зрелые адипоциты 3Т3-L1, трансдуцированные лентивирусом, кодирующим ИЛ-4, экспрессируют и секретируют ИЛ-4.....	98
3.14.Трансдукция зрелых адипоцитов 3Т3-L1 защищает зрелые адипоциты 3Т3-L1 от формирования липид-индуцированной инсулиновой резистентности.....	102
3.15.Обработка зрелых адипоцитов ИЛ-4 в условиях липид-индуцированной инсулиновой резистентности стимулирует транслокацию транскрипционного фактора STAT6 в ядро.....	105

3.16. Анализ изменения протеома зрелых адипоцитов 3T3-L1 при кратком и длительном действии ИЛ-4.....	108
<b>4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....</b>	<b>111</b>
4.1. Инсулиновая резистентности и латентное воспаление жировой ткани как следствия нарушения пролиферативного потенциала МСК ЖТ.....	111
4.2. Моделирование метаболического стресса на зрелых адипоцитах 3T3-L1.....	114
4.3. Коррекция инсулиновой резистентности с использованием рекомбинантного ИЛ-4.....	117
4.4. Коррекция инсулиновой резистентности с использованием лентивируса, кодирующего ген ИЛ-4.....	120
4.5. Действие ИЛ-4 на зрелые адипоциты связано с активирующим фосфорилированием и ядерной транслокацией транскрипционного фактора STAT6.....	122
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....</b>	<b>125</b>
<b>ВЫВОДЫ.....</b>	<b>128</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>129</b>

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АТФ – аденозинтрифосфорная кислота  
ААВ – адено-ассоциированный вирус  
БСА – бычий сывороточный альбумин  
БСА-ПК – конъюгат бычьего сывороточного альбумина с пальмитиновой кислотой  
ВОЗ – Всемирная Организация Здравоохранения  
ВЛК – врожденные лимфоидные клетки, innate lymphoid cells, ILCs  
ГПП-1 – глюкагон-подобный пептид 1 типа  
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота, кДНК – кодирующая ДНК  
ДМСО – диметилсульфоксид  
ЖТ – жировая ткань, пЖТ – подкожная ЖТ, сЖТ – сальниковая ЖТ  
ИЛ – интерлейкин  
ИР – инсулиновая резистентность  
ИЛ-4R – рецептор интерлейкина-4  
ИМТ – индекс массы тела  
ИФА – иммуноферментный анализ  
ЛПС – бактериальный липополисахарид  
МСК – мезенхимные стромальные клетки  
НГТ – нормальная толерантность к глюкозе  
ПЦР – полимеразная цепная реакция  
РНК – рибонуклеиновая кислота, мРНК – матричная РНК, миРНК – микроРНК  
СД2Т – сахарный диабет 2 типа  
СЖК – свободные жирные кислоты  
ФНО – фактор некроза опухолей  
ФСБ – фосфатно-солевой буфер  
ЭПР – эндоплазматический ретикулум  
Akt – протеинкиназа B, PKB – protein kinase type B  
AS160 – субстрат Akt массой 160 кДа, Akt substrate 160 kDa  
АМРК – АМФ-зависимая киназа, AMP-dependent kinase  
АТФ6 – активирующий транскрипцию фактор 6 типа, activating transcription factor type 6  
ASK – киназа, регулируемая сигналом апоптоза, apoptosis signal regulated kinase  
ВiР белок – белок, связывающий иммуноглобулины; binding immunoglobulin protein  
CD – кластер дифференцировки, cluster of differentiation  
DMEM – среда Дальбекко, модифицированная Иглом; Dulbecco modified Eagle's medium;  
DMEM HG – DMEM с высоким содержанием глюкозы (4.5 г/л); DMEM LG – DMEM с низким содержанием глюкозы (1 г/л)  
ERK – киназа, регулируемая внешними стимулами; extracellular signal regulated kinase  
EGM – среда для роста эндотелия, endothelial growth medium  
eGFP – усиленный зеленый флуоресцентный белок, enhanced green fluorescent protein  
FOXO1 – fork head box protein type 1  
FADH2 – флавинадениндинуклеотид восстановленный, flavin adenine dinucleotide  
FBS – фетальная бычья сыворотка, fetal bovine serum

FABP4 – белок, связывающий жирные кислоты, 4 типа; fatty acid binding protein type 4  
FACS – сортировка клеток, активируемая флуоресценцией; проточная цитометрия; fluorescence-activated cell sorting  
FGF21 – фактор роста фибробластов 21 типа, fibroblasts growth factor type 21  
GLUT4 – транспортер глюкозы 4 типа  
Grb2 – белок, связывающийся с рецепторами факторов роста, 2 типа; growth factors receptor bound protein type 2  
GSK3 – киназа гликогенсинтазы 3 типа, kinase of glycogen synthase type 3  
GRP78 – белок, регулируемый глюкозой, массой 78 кДа; glucose-regulated protein 78 kDa  
GATA3 – GATA-связывающий белок 3 типа, GATA-binding protein type 3  
GDF15 – фактор роста и дифференцировки 15 типа, growth and differentiation factor type 15  
HIF – фактор, индуцируемый гипоксией; hypoxia inducible factor  
НОМА-IR – гомеостатическая модель оценки инсулиновой резистентности, homeostatic model assessment of insulin resistance  
IR – рецептор инсулина, insulin receptor  
IRS – субстрат инсулинового рецептора, insulin receptor substrate  
IKK – киназа ингибиторной субъединицы I $\kappa$ B, I $\kappa$ B kinase  
IRE1 – фермент, нуждающийся в инозитоле, 1 типа; inositol-requiring enzyme type 1  
IRF4 – фактор, отвечающий на интерферон, 4 типа; interferon response factor type 4  
JNK – N-концевая киназа фактора c-Jun; c-Jun NH2-terminal kinase  
JAK – Janus киназа; Janus kinase  
LAR тирозиновая фосфатаза – тирозиновая фосфатаза, ассоциированная с лейкоцитарными антигенами; leukocyte antigen related tyrosine phosphatase  
LRRC59 – белок богатый лейциновыми повторами с массой 59 кДа, leucine rich repeats protein 59 kDa  
mTOR – мишень действия рапамицина, обнаруженная у млекопитающих; mammalian target of rapamycin; mTORC – комплекс киназы mTOR  
MAP-киназа – киназа, активируемая митогенами; mitogen activated protein kinase  
MCP-1 – белок, привлекающий моноциты, 1 типа; monocyte chemoattractant protein type 1  
NADH – никотинамидадениндинуклеотид, nicotinamide adenine dinucleotide  
NO – оксид азота, nitric oxide  
NF- $\kappa$ B – ядерный фактор  $\kappa$ B, nuclear factor  $\kappa$ B  
PKC – протеинкиназа C, protein kinase C  
PI-3K – киназа, зависящая от фосфатдилинозитол-трис-фосфата; phosphatidylinositol trisphosphate dependent kinase  
PIP3 – фосфатидилинозитол-трис-фосфат; phosphatidylinositol trisphosphate  
PDK – киназа, зависящая от фосфоинозитидов; phosphoinositide-dependent kinase  
PPAR – рецептор активации пролиферации пероксисом; peroxisome proliferator activated receptor  
PTP1B – тирозиновая фосфатаза белков 1B типа, protein tyrosine phosphatase type 1B  
PP1 – белковая фосфатаза 1 типа, protein phosphatase type 1  
PP2A – белковая фосфатаза 2A типа, protein phosphatase type 2A  
PTEN – гомолог фосфатазы и тензина, делетированный на 10 хромосоме; phosphatase and tensin homolog deleted on 10 chromosome

PERK – PKR-подобная киназа эндоплазматического ретикулума; PKR-like endoplasmic reticulum kinase

p300/CBP – CREB-связывающий белок; CREB-binding protein

RIPA буфер – буфер для радиоиммунопреципитации; radio immunoprecipitation assay buffer

STAT – передатчик сигнала и активатор транскрипции; signal transducer and activator of transcription

SH2-домен – домен Src-гомологии; Src-homology domain

Shc – SH2-домен содержащий трансформирующий белок; SH2-domain containing transforming protein

SHP-2 – тирозиновая фосфатаза SH2-домен содержащих белков; SH2-containing protein tyrosine phosphatase

SOS – son of sevenless protein

S6K1 – p70-рибосомальная S6 киназа 1 типа; p70-ribosomal S6 kinase type 1

SGK1 – киназа, активируемая сывороткой и глюкокортикоидами, 1 типа; serum and glucocorticoids activated kinase

SREBP1 – белок, связывающийся со стеринным регуляторным элементом, 1 типа; sterol regulatory element binding protein type 1

SHIP – SH2-домен содержащая инозитол-фосфатаза; SH2-domain containing inositol phosphatase

SFFV промотор – промотор селезеночноузелкового вируса; spleen focus forming virus promoter

TRAF6 – фактор, ассоциированный с рецептором фактора некроза опухолей, 6 типа; tumor necrosis factor receptor associated factor type 6

ТΥК – нерецепторная тирозиновая протеинкиназа; non-receptor tyrosine protein kinase

UPR – ответ на несвернутые белки; unfolded protein response

## **ВВЕДЕНИЕ**

### **Актуальность выбранной темы**

По данным ВОЗ, ожирение и ассоциированные с ним метаболические заболевания, такие как метаболический синдром и сахарный диабет 2 типа (СД2Т), становятся одной из основных причин смертности в современном мире. Помимо метаболических нарушений, ожирение и ассоциированные с ним метаболические заболевания провоцируют развитие онкологических и сердечно-сосудистых патологий, внося дополнительный вклад в смертность, ассоциированную с развитием ожирения [1, 2]. По данным Федерального регистра сахарного диабета, в России СД2Т диагностирован у 2.8% населения ( $\approx 4.2$  млн. человек), а количество пациентов с лишним весом стремительно растет как у взрослых, так и среди детей. В связи с этим, изучение молекулярно-клеточных механизмов развития инсулиновой резистентности жировой ткани, ассоциации воспаления и инсулиновой резистентности, а также механизмов развития системной инсулиновой резистентности и СД2Т является важной научной задачей.

### **Степень разработанности темы**

Главной причиной развития ожирения является нарушение баланса между расходом и потреблением энергии. В условиях высококалорийной, а также часто высокожировой диеты в сочетании с гиподинамией, современный человек крайне подвержен превышению потребления энергии над его расходом. Избыток поступающих нутриентов откладывается в состав жировой ткани, что способствует увеличению ее массы и развитию ожирения, а высокожировая диета способствует развитию гиперлипидемии [3, 4]. В условиях ожирения адипоциты, как правило, имеют увеличенный размер, что способствует развитию гипоксии, так как радиус жировых клеток начинает превышать радиус диффузии кислорода [5-7]. Постоянное избыточное поступление питательных веществ способствует перегрузке метаболических систем клетки – стрессу ЭПР, который сопровождается неправильным фолдингом белков клетки (unfolded protein response, UPR) [8-10].

Необходимость переработки поступивших нутриентов также способствует перегрузке основных окислительных станций клетки – митохондрий, что сопровождается развитием окислительного стресса [11-13].

Как гипоксия, так и стресс ЭПР и окислительный стресс – все эти факторы способны активировать основной транскрипционный фактор воспаления NF- $\kappa$ B, который, в свою очередь, способен запускать экспрессию провоспалительных генов [14-17]. После активации воспаления клетка начинает экспрессировать множество белков, среди которых есть также провоспалительные цитокины, такие как ФНО, ИЛ-1, ИЛ-8 и т.д. Провоспалительные цитокины взаимодействуют со своими рецепторами и циклически активируют воспалительный транскрипционный фактор NF- $\kappa$ B. Таким образом, адипоциты в процессе ожирения попадают в порочный круг – их физиологическое состояние в процессе ожирения провоцирует и поддерживает системное воспаление жировой ткани, которое впоследствии распространяется на весь организм [18, 19].

Несмотря на это, адипоциты – не единственный тип клеток, составляющих жировую ткань. Помимо этого в составе жировой ткани присутствуют прогениторные клетки, иммунные клетки, клетки стромы, сосудов жировой ткани и многие другие. В настоящее время известно, что прогениторные клетки жировой ткани меняют свои ангиогенные, регенеративные и другие свойства в условиях гипергликемии и СД2Т [20-22]. Однако, роль нарушений функционирования прогениторных клеток жировой ткани в формировании инсулиновой резистентности к настоящему времени не изучена. Поэтому в нашей работе мы оценивали состояние прогениторных клеток жировой ткани в ассоциации с состоянием иммунных клеток жировой ткани у пациентов с ожирением и наличием/отсутствием СД2Т.

Воспалительный фон способен критически влиять на инсулиновую чувствительность адипоцитов. В норме, инсулин, действуя на адипоцит, связывается со своим рецептором и вызывает каскад активации основных

участников инсулиновой сигнализации: субстрата инсулинового рецептора 1 типа (IRS-1), протеинкиназы В (Akt) и субстрата Akt молекулярной массой 160 кДа (AS160). Каскад последовательных фосфорилирований основных участников вызывает транслокацию инсулин-зависимого переносчика глюкозы GLUT4 в плазматическую мембрану, через который глюкоза в ответ на инсулин поступает в клетку [23-25]. Нарушения в сигнальном каскаде действия инсулина вызывают состояние, когда при действии инсулина адипоцит не может провести сигнал до стадии транслокации GLUT4. Данное состояние называется инсулиновой резистентностью [26, 27].

Формирование инсулиновой резистентности адипоцитов тесно связано с наличием латентного воспаления жировой ткани. Одним из основных механизмов является снижение активирующего тирозинового фосфорилирования IR и IRS-1 за счет конкурентного ингибирующего серин/треонинового фосфорилирования IR и IRS-1 [28-30]. Таким образом, проведение сигнала нарушается на самых upstream участках инсулиновой сигнализации. Основными киназами, осуществляющими ингибирующее серин/треониновое фосфорилирование, являются стресс-активируемые киназы, среди которых есть 2 основные киназы, активирующиеся воспалением – JNK и IKK [31, 32]. Таким образом, латентное воспаление жировой ткани способно нарушать инсулиновую чувствительность адипоцитов.

Анализируя взаимосвязи между воспалением жировой ткани и инсулиновой чувствительностью адипоцитов можно заключить, что коррекция воспалительного статуса адипоцитов является перспективной научно-практической задачей. К настоящему моменту были предприняты попытки использования стратегии блокировки воспалительных сигнальных путей для коррекции инсулиновой резистентности жировой ткани [33]. Для этого были использованы неспецифические ингибиторы воспаления (салицилаты), блокирующие антитела к ФНО, ИЛ-1 и их рецепторам. Все клинические исследования с использованием данных препаратов продемонстрировали

позитивные эффекты на состояние инсулиновой чувствительности пациентов [34-36]. Несмотря на определенные успехи в этом направлении, сочетания классических анти-диабетических препаратов, таких как метформин, сульфонилмочевина, ингибиторы дипептидилпептидазы, лираглутид, дают значительно более выраженные позитивные эффекты, поэтому к настоящему времени противовоспалительная терапия СД2Т может рассматриваться только как вариант для комбинированной терапии СД2Т.

Тем не менее, в последние годы разрабатывается новый подход к противовоспалительной терапии СД2Т – активация естественных противовоспалительных сигнальных каскадов для подавления воспаления. Классическими противовоспалительными цитокинами являются ИЛ-4 и ИЛ-13, которые, активируя транскрипционный фактор STAT6, запускают экспрессию противовоспалительных генов. К настоящему моменту, получены убедительные данные позитивного воздействия на инсулиновую чувствительность ИЛ-4 в животной модели высокожировой диеты, что опосредовано активацией миелоидной тирозингидроксилазы и формированием бежевой жировой ткани [37, 38]. Тем не менее, механизм действия и эффекты ИЛ-4 при воздействии непосредственно на зрелые адипоциты в состоянии инсулиновой резистентности остаются неизвестными.

Таким образом, **цель работы** – оценить влияние воспалительного статуса адипоцитов на формирование инсулиновой резистентности на системном и клеточном уровне, а также возможность воздействия на инсулиновую чувствительность адипоцитов путем коррекции их воспалительного статуса.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Оценить влияние различных химических индукторов метаболического стресса на формирование ИР и активацию киназы JNK1/2.
2. Получить клеточные линии МСК ЖТ пациентов с ожирением и наличием/отсутствием СД2Т из биоптатов жировой ткани.

3. Сравнить иммунофенотип тотальной популяции макрофагов жировой ткани пациентов с ожирением и наличием/отсутствием СД2Т.
4. Сравнить пролиферативную активность, способность к адипогенной дифференцировке и воспалительный статус МСК ЖТ пациентов с ожирением и наличием/отсутствием СД2Т.
5. Оценить воздействие противовоспалительного цитокина ИЛ-4 в виде рекомбинантного белка и генно-инженерной конструкции на инсулиновую чувствительность зрелых адипоцитов 3Т3-L1.
6. Проанализировать возможные механизмы воздействия ИЛ-4 на инсулиновую чувствительность зрелых адипоцитов 3Т3-L1.

#### **Научная новизна.**

Проведено исследование биоптатов подкожной и сальниковой жировой ткани пациентов с ожирением и наличием/отсутствием СД2Т. Охарактеризованы морфология адипоцитов, суммарная инфильтрация макрофагами, а также проведен субпопуляционный анализ общей популяции макрофагов жировой ткани с анализом инфильтрации M1- и M2-подобными макрофагами. Установлено, что пациенты с ожирением и наличием СД2Т имеют гипертрофический тип развития жировой ткани обоих типов (увеличенный размер адипоцитов), повышенную инфильтрацию макрофагами и смещенным общим иммунофенотипом макрофагов жировой ткани в провоспалительном направлении.

Проанализированы свойства МСК ЖТ пациентов с ожирением и наличием/отсутствием СД2Т. Продемонстрированы различия в пролиферативном статусе МСК ЖТ: как МСК подкожной жировой ткани, так и сальниковой пациентов с ожирением и наличием СД2Т значительно хуже пролиферируют, а также имеют меньшее число клеток в G2/S фазе клеточного цикла. Помимо этого, МСК ЖТ пациентов с ожирением и наличием СД2Т обладают сниженной способностью к адипогенной дифференцировке, а также имеют повышенный уровень воспаления.

Для изучения коррекции воспалительного статуса зрелых инсулинорезистентных адипоцитов была проведена сравнительная характеристика 4 моделей инсулиновой резистентности адипоцитов: с моделированием гиперлипидемии (индукция конъюгатом БСА и пальмитиновой кислоты), острого воспаления (индукция бактериальным липополисахаридом), стресса ЭПР (индукция брэфелдином А), гипоксии (индукция ионами  $Co^{2+}$ ). По совокупности 3 факторов (снижение активации инсулиновой сигнализации; снижение инсулин-индуцируемого захвата глюкозы; кинетика активации провоспалительной киназы JNK, соответствующая латентному воспалению) в качестве релевантной модели была выбрана липид-индуцируемая модель инсулиновой резистентности (с использованием конъюгата БСА и пальмитиновой кислоты).

Изучено действие противовоспалительного цитокина ИЛ-4 на состояние инсулиновой чувствительности адипоцитов в модели липид-индуцируемой инсулинорезистентности. Показано, что рекомбинантный ИЛ-4 в концентрации 50 нг/мл восстанавливает инсулиновую чувствительность зрелых адипоцитов до уровня контроля. В ходе работы получены лентивирусные конструкции с геном ИЛ-4 мыши. Данные лентивирусные конструкции высокоэффективно трансдуцируются лентивирусом с ИЛ-4 и обеспечивают его высокую экспрессию.

В ходе работы с генно-инженерным вариантом ИЛ-4 продемонстрировано, что адипоциты, трансдуцированные геном ИЛ-4 становятся невосприимчивыми к липидной индукции инсулиновой резистентности.

В ходе работы проанализирована классическая сигнализация ИЛ-4 на зрелых адипоцитах. Впервые продемонстрирована быстрая транслокация транскрипционного фактора STAT6 в ядро, с дальнейшим исчезновением данного эффекта при действии ИЛ-4 более 1 часа. Данные по транслокации STAT6 соответствуют данным по фосфорилированию транскрипционного фактора STAT6. Кроме того, в работе под действием ИЛ-4 продемонстрирована

транзиторная активация фосфорилирования pIRS1-Y612 и pAkt-S473, однако не pAkt-T308 и pAS160-S318.

Изучение влияния ИЛ-4 на протеом зрелых адипоцитов 3T3-L1 проводили с использованием "Shotgun" масс-спектрометрического анализа. В ходе работы были идентифицированы несколько гипотетических сигнальных путей, регуляция экспрессии участников которых могла быть вовлечена в реализацию эффекта ИЛ-4, в частности для протеома 3T3-L1 при 1 часе действия ИЛ-4 обнаружено изменение экспрессии белков LRRC59/импортинового каскада, который облегчает транспорт мощнейшего антидиабетического агента FGF-1 в ядро клетки, а также изменение экспрессии белка Prohibitin-1 – одного из мощных факторов митофагии. Для длительного действия ИЛ-4 (24 часа) характерна активация экспрессии ряда митохондриальных белков, а также усилению экспрессии участников цикла Кребса, что позволяет предполагать регуляцию активности митохондрий как основной эффект действия ИЛ-4 на зрелые адипоциты.

### **Теоретическая и практическая значимость**

В рамках проведенного исследования получен массив данных, демонстрирующий важную роль воспаления в формировании инсулиновой резистентности жировой ткани. Благодаря полученным данным, вновь поднимается вопрос о разработке эффективных противовоспалительных подходов к коррекции инсулинорезистентности жировой ткани. Впервые получены данные, свидетельствующие о роли МСК ЖТ в формировании СД2Т, что позволит разработать новые подходы к коррекции инсулиновой резистентности через регуляцию пролиферативных свойств МСК ЖТ.

В работе убедительно показан непосредственный характер действия противовоспалительного цитокина ИЛ-4 на зрелые адипоциты, не опосредующийся иными типами клеток, что дополняет имеющиеся мировые данные по механизмам действия ИЛ-4 на жировую ткань. Продемонстрирован потенциал практического применения генно-инженерного варианта ИЛ-4 в

качестве генно-терапевтического препарата для коррекции инсулиновой резистентности жировой ткани.

### **Методология и методы диссертационного исследования**

В работе использованы биоптаты жировой ткани пациентов с ожирением и наличием/отсутствием СД2Т. С использованием гистологических подходов была проведена оценка морфологии жировой ткани, а также ее иммунофенотипа. Работу на выделенных МСК ЖТ проводили с использованием цитологических (оценка дифференцировки, оценка пролиферативного потенциала) и биохимических подходов (оценка экспрессии адипогенных маркеров с помощью ПЦР в реальном времени, оценка фосфорилирования стресс-зависимой киназы JNK1/2 с помощью иммуноблоттинга). Для оценки инсулиновой чувствительности адипоцитов 3T3-L1 в различных моделях метаболического стресса использовали иммуноблоттинг и оценку захвата [<sup>3</sup>H]-2-дезоксиглюкозы. Для коррекции инсулиновой резистентности адипоцитов использовали как рекомбинантный ИЛ-4, так и эндогенную продукцию ИЛ-4, которую вызывали с использованием лентивирусных конструкций, кодирующих ген ИЛ-4 мыши. Механизмы действия ИЛ-4 определяли с использованием биохимических (иммуноблоттинг, масс-спектрометрия) и цитологических подходов (иммуноцитохимия и конфокальная микроскопия).

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Подкожная и сальниковая жировые ткани пациентов с СД2Т имеют повышенный уровень воспаления и гипертрофию адипоцитов.
2. МСК подкожной и сальниковой жировых тканей пациентов с СД2Т имеют сниженный пролиферативный потенциал, а также сниженную способность к адипоцитарной дифференцировке.
3. Рекомбинантный ИЛ-4 в концентрации 50 нг/мл восстанавливает инсулиновую чувствительность адипоцитов в модели липид-индуцируемой ИР.

4. Эндогенная экспрессия зрелыми адипоцитами ИЛ-4 защищает адипоциты от формирования липид-индуцированной ИР.

5. Действие ИЛ-4 на зрелые адипоциты опосредуется активирующим фосфорилированием pSTAT6-Y641 с последующей ядерной транслокацией STAT6, а также фосфорилированиями pIRS-Y612, pAkt-S473.

#### **Степень достоверности результатов проведенных исследований**

Данная работа выполнена на высоком методическом уровне с использованием современных аналитических и статистических методов. Приведенные в работе научные положения и выводы по полученным результатам основаны на достоверных данных. Достоверность результатов обусловлена необходимым числом наблюдений, а также использованием современных статистических методов.

#### **Апробация работы**

Основные результаты и положения работы были представлены и обсуждены на российских и международных конференциях: Keystone Symposia “Diabetes: New insights in molecular mechanisms and therapeutic strategies” (Japan, Kyoto, 2015), 5<sup>th</sup> Annual Meeting of International Cytokine and Interferon Society (Japan, Kanazawa, 2017), Annual Meeting of International Society of Stem Cell Research 2018 (Australia, Melbourne, 2018), European Society of Cardiology Congress 2018 (Munich, Germany, 2018), 26th Euroconference of Apoptosis (Saint-Petersburg, Russia, 2018), 16<sup>th</sup> World Congress of Insulin Resistance, Diabetes and Cardiovascular Diseases (Los Angeles, USA, 2018), Российский Национальный Конгресс Кардиологов 2017 (Россия, Санкт-Петербург, 2017), III Национальный Конгресс по Регенеративной Медицине (Россия, Москва, 2017).

#### **Публикации**

Соискатель имеет 32 опубликованные печатные работы (10 полнотекстовых статей, 22 тезиса докладов), среди которых по теме диссертации опубликовано 24 печатные работы, в том числе 5 статей в журналах, индексируемых в Scopus, Web of Science и входящих в список ВАК РФ, а также 19 тезисов докладов.

### **Связь работы с научными программами**

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ №16-34-00282 (руководитель проекта Стафеев Ю.С.), 17-34-80026 (руководитель проекта Стафеев Ю.С.) и гранта РНФ №17-15-01435 (руководитель проекта академик РАН, д.м.н. Шестакова М.В.).

### **Объем и структура научно-квалификационной работы**

Научно-квалификационная работа изложена на 155 страницах, состоит из введения, четырех глав (обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение результатов), выводов и списка литературы, включающего 260 публикаций отечественных и иностранных авторов. Научно-квалификационная работа иллюстрирована 3 таблицами и 26 рисунками.

## 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### *1.1. Инсулиновая сигнализация и ее регуляция*

По данным Всемирной Организации Здравоохранения, ожирением страдают около 30% общемировой популяции [39]. Ожирение часто ассоциировано с сахарным диабетом 2 типа (СД2Т) - сложным комплексом метаболических расстройств, основными клиническими признаками которого являются гипергликемия и гиперинсулинемия. Основным молекулярным проявлением СД2Т является состояние инсулиновой резистентности (ИР) - нарушение метаболического ответа на инсулин любого происхождения. СД2Т и инсулиновая резистентность тесно ассоциированы с развитием сердечно-сосудистых заболеваний, которые являются ведущей причиной смертности в современном мире. Поэтому, понимание молекулярных механизмов ИР, ассоциированной с ожирением, является ключевым фактором в успешной терапии как метаболических, так и сердечно-сосудистых заболеваний.

Ожирение формируется в условиях, когда поступление энергии превышает ее потребление. Инсулин является ключевым регулятором углеводного и липидного метаболизма, поэтому он играет ключевую роль в превращении дисбаланса энергии в состояние ожирения. Основная функция инсулина - утилизация глюкозы крови, концентрация которой повышается при потреблении пищи. Утилизация глюкозы осуществляется с помощью инсулин-зависимой транслокации глюкозного транспортера GLUT4 в мембрану адипоцитов и миоцитов [40, 41], а также с помощью повышения экспрессии инсулин-независимого переносчика GLUT1 в клетках эндотелия сосудов [42]. Первичный механизм развития ИР, ассоциированной с ожирением, впервые был продемонстрирован для миоцитов и гепатоцитов. Он включает в себя накопление диацилглицерола и активацию новых изоформ протеинкиназы С (PKC): PKC $\epsilon$  и PKC $\theta$  [43, 44]. Однако, данный механизм неприменим для описания механизмов формирования инсулиновой резистентности адипоцитов, которые в норме являются депо липидов и содержат в себе большое количество

диацилглицерола. Таким образом, очевидно, что механизм развития инсулиновой резистентности адипоцитов отличается от миоцитов и гепатоцитов.

На клеточном уровне, повышенная концентрация нутриентов вызывает формирование стресса ЭПР и оксидативного стресса, а гипертрофия адипоцитов формирует гипоксические условия, нарушая микроциркуляцию в жировой ткани и ухудшая доступ кислорода к адипоцитам. Совокупность данных патологических факторов стимулирует активацию основной воспалительной киназы ИКК и запускает экспрессию провоспалительных генов в адипоцитах. Активация воспаления, в свою очередь, является одним из важнейших факторов, нарушающим нормальное функционирование инсулинового сигналинга. В данном обзоре будут раскрыты основные механизмы формирования инсулиновой резистентности адипоцитов, а также рассмотрен потенциал использования противовоспалительных агентов в качестве кандидатов для терапии ИР.

### **1.1.1. Физиологическое состояние инсулиновой сигнализации**

Основное действие инсулина реализуется через запасание энергии в организме в виде гликогена и жира. Инсулин стимулирует переход глюкозы в запасной углевод гликоген в скелетных мышцах и печени через регуляцию ключевых ферментов глюконеогенеза, а также стимулирует накопление триглицеридов путем ускорения распада глюкозы в гликолизе, использование полученного ацетил-кофермента А в синтезе жирных кислот и ингибирует липолиз [45].

Инсулин действует через соответствующий рецептор, который экспрессируется на поверхности клеток инсулинзависимых тканей: жировая ткань, печень, скелетные мышцы и эндотелий [46-48]. Инсулин, помимо своего рецептора, способен связываться со значительно меньшей аффинностью с рецептором инсулин-подобного фактора роста, который экспонируется на многих типах клеток [24]. Сигнальные каскады, активируемые этими рецепторами, во многом сходны, но не идентичны, что может объяснять все многообразие клеточных

эффектов этих двух каскадов [49]. Взаимодействие между инсулином и инсулин-подобным фактором роста регулирует прогрессию СД2Т и метаболическую дисфункцию. Тем не менее, это взаимодействие не является ключевым в развитии инсулиновой резистентности [24], поэтому в данном обзоре мы не будем концентрироваться на взаимоотношениях между инсулином и инсулин-подобным фактором роста.

Рецептор инсулина представляет собой гетеротетрамерный мембранный гликопротеин, включающий две  $\alpha$ - и две  $\beta$ -субъединицы. Инсулин связывается с внеклеточной  $\alpha$ -субъединицей и стимулирует конформационный переход рецептора, открывая сайт АТФ-связывающий сайт  $\beta$ -субъединицы, которая является тирозиновой киназой. Далее происходит аутофосфорилирование  $\beta$ -субъединицы. Сайты аутофосфорилирования подразделяются на 3 основные группы: сайты аутофосфорилирования активационной петли каталитического домена (1158, 1160, 1162 остатки тирозина), сайты аутофосфорилирования околосмембранного домена (972 остаток тирозина), сайты аутофосфорилирования С-концевого домена (1328 и 1334 остатки тирозина). Фосфорилирование сайтов активационной петли активирует киназную активность рецептора инсулина, фосфорилирование околосмембранного домена контролирует стабильность рецептор-субстратного комплекса, в то время как С-концевой домен опосредует метаболические и митогенные эффекты инсулина [23].

Субстраты инсулинового рецептора (insulin receptor substrate, IRS) играют ключевую роль в инсулиновой сигнализации. Все белки этой группы являются скаффолд-белками, которые опосредуют проведение сигнала через кластеризацию сигнальных комплексов на себе с помощью SH2-доменов [50]. Активированный инсулиновый рецептор рекрутирует IRS и фосфорилирует его по остаткам тирозина, что создает сайты связывания для других сигнальных молекул, содержащих SH2-домены [25]. Таким образом, рекрутирование и связывание IRS с активированным рецептором и последующее связывание

эффекторных молекул с IRS требует тирозинкиназной активности рецептора и последующей фосфотирозин-связывающих доменов в эффекторных молекулах. Рекрутирование IRS к рецептору инсулина облегчается околочелювной локализацией IRS, которая опосредуется доменами плекстриновой гомологии в составе IRS, которые узнают мембранные фосфоинозитиды. Таким образом, IRS проявляют двойственную функцию, связывая рецептор-ассоциированные тирозинкиназы с цитоплазматическими эффекторами и собирая вместе участников сигнальных путей, содержащих SH2-домены [51].

В группе IRS выделяют 6 изоформ данного белка. Наиболее распространенным и повсеместно экспрессирующимся субстратом инсулинового рецептора является IRS-1. Мыши, нокаутные по IRS-1, демонстрируют ухудшение роста и сниженную активность инсулинового сигнального каскада, однако системная глюкозная толерантность остается в рамках нормы [52]. Мыши, нокаутные по IRS-2, демонстрируют замедленный рост и развитие лишь в некоторых тканях, преимущественно в нейронах и клетках островков Лангерганса [53]. Такие мыши имеют сниженную активность инсулиновой сигнализации в печени, а также дисфункцию островков Лангерганса. Совокупность нарушений, полученных в результате нокаута, приводит к специфической форме сахарного диабета. Экспрессия IRS-3, IRS-4, IRS-5 и IRS-6 является тканеспецифичной. Для грызунов, IRS-3 представлен в адипоцитах, легких и печени [54], в то время как для человека ген *IRS-3* является псевдогеном [55]. Экспрессия IRS-4 детектируется в скелетных мышцах, печени, сердце, мозге и почках [56]. Мыши, нокаутные по IRS-4, демонстрируют частичное ухудшение роста и глюкозной толерантности [57]. IRS-5 экспрессируется в почках и печени; IRS-6 обнаруживается в основном в скелетных мышцах. IRS-5 и IRS-6 являются минорными субстратами инсулинового рецептора [58].

IRS белки разветвляют сигнал от инсулина и позволяют формировать сигнальные сети, обеспечивающие сложные метаболические ответы клетки. PI-3-киназный (PI-3K) сигнальный каскад обеспечивает большинство

метаболических эффектов инсулина, в то время как другие сигнальные пути опосредуют митогенные эффекты и тормозят инсулиновый сигналинг [25]. Независимо от PI-3K, IRS белки связывают адаптерные белки Grb2, Shc, Crk, Cbl и тирозиновую фосфатазу SHP-2 [51]. Grb2 привлекает фактор обмена гуаниловых нуклеотидов SOS, который активирует Ras ГТФазу и Erk1/2 MAP-киназный каскад. Данная сигнализация опосредует реорганизацию цитоскелета, пролиферацию и дифференцировку [25]. Crk является адаптерным белком, который перенаправляет сигнал на белок p130Cas, который инициирует перестройку цитоскелета [59]. Cbl белок является E3-убиквитин лигазой, свойственной для многих рецепторных тирозинкиназ, которая контролирует интернализацию и деградацию рецептора в случае гиперактивации. Функция фосфатазы SHP-2 заключается в инактивации IRS с помощью дефосфорилирования, которая позволяет IRS избежать протеасомной деградации.

Метаболические эффекты инсулина опосредуются PI3 киназой класса 1A (PI-3K). Данная киназа представляет собой гетеродимер трех каталитических субъединиц (p110 $\alpha$ , p110 $\beta$  и p110 $\delta$ ) и пяти p50-55/p85 регуляторных субъединиц [60]. PI3K рекрутируется к IRS, фосфорилированному по остаткам тирозина, через SH2-домены, содержащиеся в регуляторных субъединицах. Последующая активация включает в себя снятие ингибирования с p110 каталитической субъединицы и связывание активированной Ras ГТФазы через Ras-связывающий домен, представленный в каталитической субъединице. Учитывая околочелювную локализацию всего сигнального модуля вблизи PI3K, а также одновременную активацию Ras с помощью IRS, в результате описанных событий происходит полная активация PI3K. PI3K фосфорилирует 3'-позицию инозитольного кольца фосфатидинозитол-содержащих фосфолипидов, образуя фосфатидинозитол-3,4-бисфосфат и фосфатидинозитол-3,4,5-трисфосфат (PIP3) [60].

Сигналинг PI3K включает в себя белок-липидные взаимодействия, опосредуемые доменами плекстриновой гомологии. Они распознают остатки фосфорной кислоты в составе фосфатидилинозитольных липидов. Несмотря на общие черты, домены плекстриновой гомологии различаются по своей структуре и специфичности. Некоторые из них узнают фосфатный остаток в определенных позициях инозитола, а также количество фосфатных остатков в этой позиции. Другие домены плекстриновой гомологии узнают фосфаты в разных позициях инозитола. Типичные PI3K эффекторы содержат домены плекстриновой гомологии, которые распознают 3'-фосфорлированное инозитольное кольцо. Эти эффекторы в основном принадлежат к семейству AGC киназ (протеинкиназы A, G, C как основные участники семейства) [61]. В инсулиновый сигналинг вовлечены многие киназы этого семейства: фосфоинозитид-зависимая киназа 1 типа (PDK-1), протеинкиназа B (PKB, а.к.а. Akt), p70 рибосомальная S6 киназа (S6K1), киназа, регулируемая сывороткой и глюкокортикоидами (SGK1) и атипичные изоформы протеинкиназы C (aPKC), которые не требуют Ca<sup>2+</sup> и диацилглицерола для активации [25]. Как PDK-1, так и Akt содержат домен плекстриновой гомологии, который связывает PIP3 на мембране. Таким образом, происходит их пространственное сближение и PDK-1 фосфорилирует Akt по остатку Thr-308, расположенному в ее активационной петле [62]. Аналогичным образом, PDK-1 служит мастер-киназой для активации aPKC, S6K1, SGK1 и других AGC киназ [63]. Чтобы быть успешно активированными PDK-1, перечисленные киназы должны также иметь сайты докинга для взаимодействия с PDK-1. Эти сайты создаются путем дополнительного фосфорилирования их гидрофобных мотивов. Они рекрутируют и активируют PDK-1, которая затем фосфорилирует активационные петли AGC киназ [64].

Для киназы Akt сайтом фосфорилирования в гидрофобном мотиве киназы является Ser-473. В отличие от других AGC киназ, его фосфорилирование не обязательно для активации Akt, оно лишь необходимо для максимальной

каталитической активности [61]. Это фосфорилирование выполняется группой Р13К-ассоциированных киназ, включая киназу mTOR, ДНК-зависимую протеинкиназу и ИКК. Киназа mTOR находится в динамическом равновесии между двумя белковыми комплексами, mTORC1 и mTORC2, которые собираются на каркасных белках Raptor и Rictor, соответственно. К настоящему моменту взаимодействия между этими двумя комплексами остаются неизученными. Учитывая центральную роль киназы mTOR в контроле клеточного метаболизма, пролиферации, роста, выживания и старения, вероятнее всего mTOR является активным участником регуляторных схем и разветвленных сигнальных сетей [65]. По данным литературы, mTORC2 является киназой, активирующей Akt, в то время как mTORC1 является непрямым мишенью Akt [66]. Помимо mTORC2, другие киназы фосфорилируют Ser-473 в составе Akt в ходе стрессовых ответов. ДНК-зависимая протеинкиназа активируется разрывами двойной цепи ДНК и фосфорилирует Akt, помогая выживанию клетки при ДНК-повреждении [67].

Akt имеет много внутриклеточных мишеней и опосредует большое количество метаболических эффектов в адипоцитах. Akt регулирует глюкозный метаболизм через фосфорилирование TBC1D4 белка, известного как AS160, а также киназы гликогенсинтазы 3 типа (GSK3). AS160 является ГТФаза-активирующим белком, который ингибирует активность Rab10 и внутриклеточный трафик GLUT4-содержащих везикул. Akt снимает это ингибирование, стимулируя транслокацию GLUT4 в плазматическую мембрану адипоцита и вызывая рост инсулин-индуцируемого захвата глюкозы [25]. Akt также фосфорилирует GSK3 в печени и скелетных мышцах, активируя, таким образом, синтез и накопление гликогена [68]. Кроме того, инсулин имеет Akt-независимые эффекты на метаболизм глюкозы. Инсулин повышает активность фосфатазы пируватдегидрогеназы, таким образом стимулируя превращение пирувата в ацетил-кофермент А и активируя ацетил-кофермент А карбоксилазу, которая, в свою очередь, превращает ацетил-кофермент А в малонил-

кофермент А и активирует последующий синтез жирных кислот. Инсулин способен активировать липолиз и повышать содержание триглицеридов в адипоцитах как Akt-зависимо, так и Akt-независимо [45]. Все вместе эти действия инсулина способствуют утилизации глюкозы крови и запасанию энергии через активацию синтеза гликогена, синтез жирных кислот и запасание липидов.

Киназа Akt опосредует адипогенные эффекты инсулина. Akt регулирует mTORC1 [25], который активирует один из главных регуляторов адипогенеза - белок SREBP1 (sterol regulatory element binding protein type 1), который активирует транскрипцию генов *FABP4*, *ADIPOQ*, *AGPAT2*. Другой путь регуляции адипогенеза с помощью инсулина - ингибирование транскрипционного фактора FOXO-1 с помощью его фосфорилирования киназой Akt, что освобождает транскрипционный фактор PPARgamma, мастер-регулятор адипогенеза [69]. Параллельно с этим, фосфорилирование с помощью Akt PGC-1 $\alpha$  снижает способность PPARgamma активировать глюконеогенез и окисление жирных кислот, что стимулирует развитие жировой ткани [25, 70].

### **1.1.2. Обратные связи и регуляция инсулиновой сигнализации**

Неконтролируемая активность инсулинового сигнального каскада вызывает нарушения метаболизма как на клеточном уровне, так и на уровне целого организма, что может приводить к канцерогенезу и развитию других заболеваний [25, 71]. Поэтому, инсулиновая сигнализация должна иметь регуляторные механизмы для контроля за уровнем активности. Контроль за активностью инсулинового сигнального каскада осуществляется практически на всех этапах передачи сигнала и реализуется по-разному в разных типах клеток.

Одним из регуляторных механизмов является регуляция деятельности киназ с использованием активации белковых фосфатаз. Для регуляции тирозинового фосфорилирования инсулинового рецептора и IRS используется 2 типа

тирозиновых фосфатаз - цитоплазматическая PTP1B и трансмембранная LAR [72]. Среди серин-треониновых фосфатаз основными являются фосфатазы PP1 и PP2A. PP1 фосфатаза принимает участие в регуляции глюкозного и липидного обмена, изменяя активность гликоген синтазы, гормон-чувствительной липазы и ацетил-кофермент А карбоксилазы [73]. PP2A фосфатаза регулирует активность многих протеинкиназ, вовлеченных в инсулиновую сигнализацию: Akt, PKC, Erk, IKK. Недавние исследования показывают, что при СД2Т активность PP2A фосфатазы значительно повышена [74]. Другие серин-треониновые фосфатазы также принимают активное участие в регуляции инсулиновой сигнализации: протеинфосфатаза PP2B способна дефосфорилировать Akt, а некоторые члены семейства протеинфосфатаз PP2C способны дефосфорилировать и Akt, и PKC.

Другим участником регуляции активности инсулиновой сигнализации являются липидные фосфатазы. Их действие сконцентрировано на вторичном посреднике PIP3. Основной регуляторной липидфосфатазой для PIP3 является PTEN (phosphate and tensin homolog deleted on chromosome 10). PTEN, совместно с p85alpha регуляторной субъединицей, образуют регуляторную систему для контроля синтеза и распада PIP3 [75]. Помимо PTEN, для дефосфорилирования PIP3 используются липидфосфатазы семейства SHIP (SH2-domain containing inositol-5-phosphatases). SHIP2 принимает активное участие в инсулиновой сигнализации, что продемонстрировано в экспериментах на нокаутных по SHIP2 мышах, а гиперэкспрессия SHIP2 вызывает снижение инсулиновой сигнализации во всех инсулин-зависимых тканях [76, 77].

Ключевым регулятором ингибиторным механизмом инсулиновой сигнализации является серин/треониновое фосфорилирование IRS, который разветвляет инсулиновую сигнализацию на сигнальные сети. В составе IRS присутствует множество остатков серина и треонина, которые являются мишенями различных протеинкиназ. Активация этих остатков вступает в антагонизм с

активационным тирозиновым фосфорилированием IRS, которое необходимо для проведения сигнала. Основные серин/треониновые киназы, мишенью которых является IRS, это стресс-активируемые киназы (Erk, JNK, AMPK), воспалительная киназа IKK и киназы более низкого порядка в иерархии инсулиновой сигнализации (Akt, aPKC, mTOR, S6K1) [30]. Ингибиторный эффект серин/треонинового фосфорилирования реализуется различными путями, среди которых диссоциация IRS от инсулинового рецептора, ингибирующая тирозинкиназную активность инсулинового рецептора; блокирование тирозинового фосфорилирования IRS; повышение деградации IRS; высвобождение из комплекса с IRS адаптерных белков [28, 29]. Основным результатом ингибиторного серин/треонинового фосфорилирования является снижение клеточного ответа на стимуляцию инсулином и ИР.

Нарушения инсулиновой сигнализации часто проявляются ИР, которая является самым ранним признаком развития СД2Т и метаболических заболеваний [78]. Генетическая предрасположенность и метаболическая дисфункция являются двумя основными причинами СД2Т. По данным ВОЗ, генетически-обусловленные случаи ИР составляют ничтожный процент, по сравнению с приобретенной ИР. Молекулярные механизмы приобретенной ИР скорее всего связаны с вышеупомянутыми отрицательными обратными связями и нарушениями инсулиновой сигнализации. Каковы основные причины метаболической дисфункции, а также как и почему она переходит в ИР и СД2Т остаются критическими вопросами для понимания развития ИР и СД2Т.

## ***1.2. Ассоциация ожирения и латентного воспаления жировой ткани***

### **1.2.1. Пусковые механизмы развития воспаления при ожирении**

В свете данных литературы становится очевидно, что избыточное поступление калорий - основная причина эпидемии ожирения в современном обществе [79]. В сочетании с низкой физической активностью, избыточное количество нутриентов быстро конвертируется в жир, который используется для долгосрочного запасания энергии в организме. Ожирение стимулирует

развитие инсулиновой резистентности через эктопическое накопление липидов и активацию РКС в скелетных мышцах и печени [43]. Однако очевидно, что в случае жировой ткани данный механизм не может работать, так как адипоциты являются естественными депо жира и не способны к эктопическому отложению липидов. Тем не менее, избыток поступления липидов способен нарушать и физиологию жировой ткани. Активное поступление липидов способно вызывать «ожирение» адипоцитов - формирование гипертрофического типа ожирения, когда объем и масса жировой ткани растут, не изменяя при этом числа дифференцированных жировых клеток [80]. Для гипертрофического роста адипоцитов необходима перестройка внеклеточного матрикса. Различные протеазы принимают участие в этом процессе, в частности, катепсин К вызывает деградацию коллагенов I и II типов. Катепсин К также расщепляет ключевой белок внеклеточного матрикса - фибронектин [81]. Экспрессия катепсина К при ожирении значительно повышена, также показано, что катепсин К способен стимулировать дифференцировку преадипоцитов человека [82]. Важной мишенью для катепсина К является белок SPARC - белок внеклеточного матрикса, модулирующий взаимодействие клетки с внеклеточным матриксом. Снижение его концентрации ассоциировано с гипертрофией адипоцитов так же, как и снижение концентрации коллагена I типа [81]. Другими важными событиями в ремоделировании внеклеточного матрикса, ассоциированом с гипертрофией и ожирением является секреция матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов. Так, повышение концентрации тканеспецифичного ингибитора металлопротеиназ 1 типа наблюдается при гипертрофии адипоцитов, а снижение активности его мишеней, матриксных металлопротеиназ 2 и 9 типов, ассоциировано с развитием гипертрофии адипоцитов [81].

Гипертрофия адипоцитов и избыточное поступление нутриентов инициируют целую цепь патологических событий. Увеличение размера адипоцитов связано с увеличением их радиуса, который со временем начинает превышать радиус

свободной диффузии кислорода, что вызывает развитие гипоксии жировой ткани. Рост размеров адипоцитов также не сопровождается увеличением сердечного выброса и скорости потока крови, что приводит к ухудшению снабжения жировой ткани кислородом и нутриентами [6]. Гипоксия является одной из причин, вызывающих латентное воспаление гипертрофированной жировой ткани, что было убедительно продемонстрировано в ряде работ [6, 7, 83, 84]. Рассмотрим подробнее молекулярные механизмы, связывающие между собой гипоксию и воспаление.

Транскрипционный фактор HIF-1 (hypoxia inducible factor) является основным элементом клеточной защиты в гипоксических условиях. Транскрипционный фактор представляет собой гетеродимерный ДНК-связывающий комплекс из двух белков, содержащих ДНК-связывающие домены типа «helix-loop-helix». HIF-1 $\beta$  субъединица является конститутивно экспрессирующейся, в то время как экспрессия субъединицы HIF-1 $\alpha$  индуцируется и зависит от гипоксии. После сборки комплекс HIF связывается с пентануклеотидной консенсусной последовательностью ДНК (RCGTG) в специфических областях генов-мишеней [85]. Стабильность HIF-1 $\alpha$  и ее активность сильно зависит от содержания кислорода в среде. В нормоксических условиях в составе HIF-1 $\alpha$  гидроксильрован только один пролин. В этом состоянии HIF-1 $\alpha$  узнается  $\beta$ -субъединицей белка фон Хиппель-Линдау, который рекрутирует к HIF-1 $\alpha$  убиквитинлигазу и способствует его дальнейшей протеасомной деградации. Чувствительность к гипоксии для HIF реализуется через пролилгидроксилазы, активность которых регулируется молекулярным кислородом. В условиях гипоксии пролилгидроксилазы не способны гидроксильровать регуляторные остатки пролина в составе HIF-1 $\alpha$ . Таким образом, HIF-1 $\alpha$  не расщепляется в протеасоме, HIF-1 $\alpha$  ассоциируется с HIF-1 $\beta$  и этот комплекс связывается с консенсусной последовательностью ДНК, регулируя «гипоксические» гены [86]. Ассоциация гипоксии с воспалительной сигнализацией продемонстрирована во многих работах [87-89]. Основным примером такой

ассоциации являются тесные взаимоотношения между гипоксической и NF-κB-зависимой сигнализацией. Одним из целевых генов, экспрессия которого активируется под действием HIF-комплекса, является ген NF-κB; в результате происходит активация воспалительного процесса. HIF-ингибирующие факторы способны негативно регулировать активность основной воспалительной киназы IKK и ингибировать воспаление [90]. В связи с этим, очевидно, что гипоксические условия провоцируют развитие воспаления жировой ткани.

Другой причиной развития латентного воспаления жировой ткани является стресс ЭПР, который возникает при перегрузке ЭПР некорректно свернутыми белками. ЭПР включает в себя различные варианты шаперонов (BiP, GRP78, кальнексин/кальретикулиновая система), однако, при биосинтетической активности, превышающей функциональную емкость ЭПР, шапероны не успевают справляться с возрастающей нагрузкой [91]. В результате, склонные к агрегации некорректно свернутые белки накапливаются в люмене ЭПР. Некорректное взаимодействие несвернутых белков с другими компонентами клетки, а также агрегация белков, являются процессами чрезвычайно опасными для клетки. Главная стратегия преодоления такой ситуации - UPR (unfolded protein response). Первой стадией UPR является адаптивное снижение биосинтетической активности, где принимают участие 3 основных белка - ATF6, PERK и IRE1. В ходе ответа PERK репрессирует общий синтез белка, а IRE1 участвует в деградации транслируемых мРНК.

Если ответ первой стадии оказался неэффективен, клетка задействует вторую линию защиты от стресса ЭПР, в которой участвует апоптозный сигналинг. На примере IRE1 показано, что IRE1 активирует апоптозную киназу ASK через транскрипционный фактор TRAF6, а также каспазу-12 [92].

Третьей основной причиной развития воспаления жировой ткани при ожирении является окислительный стресс. Окислительный стресс сопровождается развитием множества заболеваний: атеросклероза, сердечно-сосудистых заболеваний, СД2Т и ожирения. Происхождение окислительного стресса в составе жировой

ткани в ответ на гиперкалорийную диету кроется в активной работе митохондрий и окислительных систем клетки в попытках переработать избыточное количество нутриентов. В метаболизме глюкозы генерация доноров электронов происходит в виде NADH и FADH<sub>2</sub>, которые используются в производстве супероксид анион радикала [93]. В случае избыточного поступления свободных жирных кислот появляются подобные эффекты, связанные с генерацией доноров электронов в beta-окислении жирных кислот и окислении ацил-кофермент А производных. Другой возможной причиной формирования супероксид анион радикала является повышение поглощения кислорода сердечно-сосудистой системой при ожирении, а также продукцией ФНО $\alpha$  при клеточном повреждении и высокожировой диете [94]. Таким образом, окислительный стресс способствует экспрессии провоспалительных цитокинов, которые, в свою очередь, также способны стимулировать окислительный стресс, формируя петлю положительной обратной связи, что поддерживает латентное воспаление жировой ткани.

### **1.2.2. Изменения иммунофенотипа жировой ткани при ожирении**

Запуск воспалительного процесса, сопровождающий ожирение, критически изменяет иммунофенотип всей жировой ткани, вызывая поляризацию практически всех типов резидентных иммунных клеток, а также привлекая иммунные клетки из других источников [95]. Поляризация иммунных клеток представляет собой процесс обратимого изменения паттернов экспрессии генов в направлении активации экспрессии провоспалительных генов: ФНО $\alpha$ , NF- $\kappa$ B, индуцибельная NO-синтаза и т.д. [96-98]. Подобные изменения фенотипа иммунных клеток способствуют поддержанию воспалительного микроокружения адипоцитов. Рассмотрим процессы поляризации основных типов иммунных клеток в составе жировой ткани при ожирении.

Первичными клетками, которые организуют и регулируют состояние иммунофенотипа жировой ткани в дальнейшем, являются врожденные лимфоидные клетки (ВЛК, innate lymphoid cells). Выделяют 3 основных

фенотипа ВЛК, обладающих различными паттернами секреции, поверхностных маркеров, а также генной экспрессии. В основе классификации лежит экспрессия разных транскрипционных факторов, так для ВЛК 1 типа характерна активность транскрипционного фактора T-bet, для ВЛК 2 типа - GATA3, для ВЛК 3 типа - ROR $\gamma$ T [99, 100]. ВЛК 1 и 3 типов можно охарактеризовать как воспалительные, так как основным секретлируемым фактором для ВЛК 1 типа является интерферон гамма, а для ВЛК 3 типа - ИЛ-22, являющийся членом семейства провоспалительного цитокина ИЛ-10 [101]. В настоящее время продемонстрировано, что ВЛК 2 типа, секретлируя противовоспалительные ИЛ-5 и ИЛ-13, поддерживают гомеостаз жировой ткани в норме [102], в то время как ВЛК 1 типа стимулируют латентное воспаление жировой ткани [103]. Более того, продемонстрирована роль ВЛК 1 типа как регуляторов поляризации макрофагов жировой ткани [104], поэтому ВЛК 1 типа играют критическую роль в формировании латентного воспаления и инсулиновой резистентности жировой ткани [105].

Тесную взаимосвязь с ВЛК демонстрируют Т-лимфоциты, которым также свойственен процесс поляризации. Взаимное поддержание провоспалительного фенотипа как ВЛК, так и Т-клеток происходит на паракринном уровне. Среди Т-лимфоцитов в составе жировой ткани выделяют Т-киллеры (CD8 $^{+}$ -лимфоциты), Th1-лимфоциты, Th2-лимфоциты, Th17-лимфоциты и Treg-лимфоциты. Так же, как и в случае ВЛК, подтипы хелперных лимфоцитов различаются по экспрессии транскрипционных факторов, которые активируют эффекторные гены. Так Th1-лимфоциты экспрессируют транскрипционные факторы T-bet и Blimp1, Th2 - GATA3 и Blimp1, Th17 - ROR $\gamma$ T и IRF4 [106]. Гомеостаз жировой ткани поддерживается Th2- и Treg-лимфоцитами, которые секретлируют противовоспалительные цитокины (ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-13 для Th2 и ИЛ-10 и трансформирующий фактор роста бета для Treg), факторы роста и негативно регулируют численность воспалительных Т-клеток [107, 108]. Развитие ожирения сопровождается значительной инфильтрацией жировой

ткани Th1- и Th17-лимфоцитами [109-111]. Секретируемые факторы Th1- и Th17-лимфоцитов (интерферон гамма для Th1; ИЛ-17, ИЛ-21 и ИЛ-22 для Th17) являются провоспалительными и с их помощью в жировой ткани поддерживается конститутивный уровень воспаления [112].

Помимо Т-лимфоцитов, активное участие в поддержании латентного воспаления жировой ткани принимают В-лимфоциты. Жировая ткань при ожирении значительно инфильтрирована В-лимфоцитами, по сравнению с нормальной жировой тканью [113]. Активация В-лимфоцитов в условиях ожирения осуществляется, по видимому, через взаимодействие молекулярных паттернов, ассоциированных с повреждением клеток (свободные жирные кислоты, внеклеточная ДНК, фрагменты апоптотических и некротических клеток и т.д.), с Толл-подобными рецепторами [114]. В-лимфоциты активно участвуют в провоспалительной поляризации макрофагов, активно поддерживая латентное воспаление жировой ткани [115, 116].

Наименее изученной группой иммунных клеток в вопросе патогенеза СД2Т являются дендритные клетки. Основной причиной является трудность дифференциации дендритных клеток от М1-макрофагов по паттернам поверхностных маркеров, так как они очень близки [117, 118]. Тем не менее, убедительно продемонстрирована роль дендритных клеток в поддержании латентного воспаления жировой ткани: в животной модели высокожировой диеты продемонстрирована повышенная инфильтрация жировой ткани дендритными клетками при ожирении, причем дендритные клетки являются регуляторами дифференцировки Т-лимфоцитов [109], а генетическое удаление дендритных клеток в животной модели высокожировой диеты восстанавливает инсулиновую чувствительность животных [119].

Однако, наиболее эффекторной популяцией иммунных клеток, регулирующих инсулиновую чувствительность жировой ткани, являются макрофаги. В их поляризации принимают участие различные типы иммунных клеток: натуральные киллеры [120, 121], дендритные клетки [119], ВЛК [104] и многие

другие. Выделяют 2 основных фенотипа макрофагов - M1 и M2 макрофаги [122]. Резидентные макрофаги жировой ткани имеют преимущественно M2 или противовоспалительный фенотип. Латентное воспаление жировой ткани обычно стимулируют M1-макрофаги. Биохимия взаимодействий между макрофагами и адипоцитами остаются важным аспектом формирования ИР при ожирении.

Проблема поляризации макрофагов жировой ткани является критической в развитии ожирения и СД2Т. Процесс поляризации является строго контролируемым: он базируется на взаимодействии сигнальных путей, транскрипционных факторов и эпигенетических механизмов. Канонический IRF/STAT сигнальный каскад, активируемый интерферонами и Толл-подобными рецепторами сдвигает фенотип макрофагов в сторону M1-поляризации, в то время как цитокины ИЛ-4 и ИЛ-13 STAT6-зависимым образом сдвигают фенотип макрофагов в M2-поляризацию [123]. Таким образом, секретом жировой ткани в состоянии ожирения активно стимулирует M2-M1 поляризацию макрофагов с формированием латентного воспаления жировой ткани [27].

Суммируя все вышесказанное, можно сказать, что при формировании ожирения фенотип жировой ткани критически меняется в сторону провоспалительного направления, что способствует формированию ИР и поддержанию латентного воспаления жировой ткани.

### **1.2.3. Ожирение и МСК ЖТ**

Мезенхимные стромальные клетки жировой ткани (МСК ЖТ) представляют собой гетерогенную популяцию клеток, которые характеризуются экспрессией поверхностных маркеров CD34, CD73, CD90, CD105, CD146; отсутствием экспрессии поверхностных маркеров CD45, CD31, CD14, а также способностью к дифференцировке в адипогенном, хондрогенном и остеогенном направлениях [124, 125]. Фракция МСК ЖТ содержит в своем составе преадипоциты - прогениторные клетки жировой ткани, которые дают начало адипоцитам,

новым жировым депо [126, 127], поэтому МСК ЖТ можно считать ключевым типом клеток, который будет определять тип развивающегося ожирения. По изменению морфологии адипоцитов выделяют 2 основных типа ожирения: гипертрофическое и гиперпластическое [128, 129]. Гипертрофическое ожирение сопровождается увеличением размеров адипоцитов, не происходит формирования новых жировых депо за счет пролиферации и дифференцировки преадипоцитов. Гиперпластическое ожирение сопровождается увеличением количества адипоцитов с сохранением их нормального размера. Как говорилось выше, гипертрофия адипоцитов способствует развитию латентного воспаления жировой ткани и ИР, в то время как гиперпластическое ожирение, как правило, не сопровождается нарушениями углеводного обмена. По видимому, различия в типах ожирения обуславливают все чаще выявляемую нестрогую корреляцию между ожирением и развитием ИР и СД2Т [130].

Помимо роли преадипоцитов в развитии ИР и формировании новых жировых депо, стоит отметить иммуномодуляторную способность МСК ЖТ, которая способна корректировать уровень воспаления жировой ткани [131-133]. Во многих работах продемонстрирован позитивный эффект системного введения МСК ЖТ для коррекции ИР, причем механизм позитивного воздействия связан с поляризацией иммунных клеток жировой ткани [134-137]. Также стоит отметить, что аутологичное введение МСК ЖТ пациента с СД2Т для коррекции ИР невозможно, так как МСК ЖТ в инсулинорезистентной жировой ткани значительно отличаются от здоровых МСК ЖТ [138-140]. Таким образом, можно сказать, что МСК ЖТ играют важную роль в формировании и поддержании латентного воспаления жировой ткани, регулируя тип ожирения и иммунный статус жировой ткани.

### ***1.3. Интерлейкин-4 как перспективный терапевтический агент для коррекции инсулинорезистентности жировой ткани***

Анализируя данные о критической роли воспаления в развитии ИР, можно отметить, что использование противовоспалительных препаратов может

являться перспективным подходом в коррекции ИР и терапии СД2Т. Концепцию противовоспалительного подхода в современной диабетологии впервые описал в своей фундаментальной работе профессор Notamislil и соавторы [141], где была продемонстрирована роль ФНО в развитии ИР в животной модели высокожировой диеты. Первое клиническое испытание с использованием антагонистов ФНО было инициировано в 1996 году, где использовались блокирующие антитела к ФНО. Возможно, небольшое число пациентов (10 больных) и разовое введение антител не позволили в полной мере продемонстрировать потенциал данной технологии [34]. Значимые позитивные эффекты были показаны с использованием фьюжен-белка из растворимого рецептора ФНО и Fc-фрагмента антитела, который получил название этанерцепт. Данный препарат вводили регулярно на протяжении 26 недель и продемонстрировали статистически значимое снижение уровня глюкозы крови натощак, а также рост концентрации высокомолекулярного адипонектина крови [142].

Дальнейшие исследования продемонстрировали критическую роль воспалительной киназы ИКК в формировании ИР [35]. Для блокирования воспаления был давно известен неспецифический ингибитор ИКК салицилат, который попробовали применить для коррекции ИР. Салицилат применяли в течении 12 [143, 144] или 48 недель [145] для терапии пациентов с СД2Т, было убедительно продемонстрировано снижение уровня глюкозы крови натощак, гликированного гемоглобина и триглицеридов [143-145]. Помимо вышеописанных препаратов в качестве противовоспалительных подходов к коррекции ИР также применялись блокирующие антитела к ИЛ-1 $\beta$  и его рецептору, они продемонстрировали весьма небольшие позитивные эффекты на инсулиновую чувствительность [146-148].

На сегодняшний день многие терапевтические подходы еще ожидают своего клинического применения. Среди возможных молекул мишеней регуляторы МСР-1 [149], регуляторы эпигенетического статуса клетки

(сиртуины) [150], регуляторы синтеза провоспалительных медиаторов (12-липоксигеназа, 15-липоксигеназа и т.д.) [151] и многие другие. Однако, наиболее перспективным подходом является активация естественных противовоспалительных сигнальных каскадов. Наиболее физиологичным активатором противовоспалительных сигнальных каскадов являются противовоспалительные цитокины ИЛ-4 и ИЛ-13. В нашей работе мы обсудим роль ИЛ-4 в коррекции ИР в жировой ткани.

### **1.3.1.Интерлейкин-4: сигнализация и физиологические эффекты**

ИЛ-4 представляет собой цитокин плеiotропного действия, секретируемый активированными Т-клетками, тучными клетками, базофилами и эозинофилами [152]. ИЛ-4 имеет типичную цитокиновую структуру (4 альфа-спирали, одна бета-складка) и молекулярную массу от 12 до 20 кДа, что определяется его гликозилированием. ИЛ-4 имеет довольно высокую гомологию с ИЛ-13, выполняя сходные с ним функции [153, 154]. Как ИЛ-4, так и ИЛ-13 являются цитокинами с ярко выраженными противовоспалительными свойствами, управляя поляризацией иммунных клеток в противовоспалительном направлении [19].

Сигнализация ИЛ-4 осуществляется через специфический рецептор. Рецептор ИЛ-4 представляет собой гетеродимерный комплекс, в составе которого обязательно присутствует ИЛ-4R $\alpha$ , который обладает высокой аффинностью к ИЛ-4. Далее возможно формирование двух типов рецептора: гетеродимера ИЛ-4R $\alpha$  с гамма-цепью ИЛ-2R $\gamma$  и гетеродимера ИЛ-4R $\alpha$  с ИЛ-13R $\alpha$ 1. В трансдукции сигнала ИЛ-4 принимают оба типа рецептора, однако при трансдукции используются разные типы тирозиновых киназ: JAK1 и JAK3 для 1 типа рецептора и JAK1 и TYK2 для 2 типа рецептора [155].

Следующим этапом сигнализации является рекрутирование скэффолд-белка к фосфорилированному рецептору. Роль такого каркасного белка для ИЛ-4R выполняют IRS-1 (преимущественно в негематопоэтических клетках) и IRS-2 (преимущественно в гематопоэтических клетках). На IRS собираются

дальнейшие сигнальные каскады, опосредующие митогенные эффекты ИЛ-4, с участием Akt сигнального каскада и Grb2 сигнального каскада [156, 157].

Однако, эффект ИЛ-4 на генную экспрессию осуществляется через транскрипционный фактор STAT6, который фосфорилируется по остатку Tyr-641 и димеризуется в цитоплазме, после чего транслоцируется в ядро [158]. В ядре димер STAT6 связывается со своим специфическим сайтом TTC-GAA, разделенный 4 нуклеотидами [159]. STAT6 часто взаимодействует с другими транскрипционными факторами, такими как p300/CEBP и NF-κB. На активность связывания с ДНК оказывают влияние и другие посттрансляционные модификации STAT6: ацетилирование, метилирование или сериновое фосфорилирование. STAT6 зависимый сигнальный путь является центральным в активации противовоспаления в клетке [160-162].

ИЛ-4 играет огромную роль как в норме, так и при различных патологиях. Общая функция ИЛ-4 в иммунной системе - управление противовоспалительной поляризацией всех типов иммунных клеток, а также пролиферацией иммунных клеток [163, 164]. Помимо этого, ИЛ-4 принимает участие в жизнедеятельности других типов клеток. ИЛ-4 контролирует пролиферацию эндотелиальных клеток, повышает эффективность взаимодействия эндотелиальных клеток с клетками иммунитета, что позволяет поддерживать противовоспалительный иммунофенотип сосудистой стенки [165]. В гепатоцитах ИЛ-4 блокирует липогенез, приводящий к эктопическому отложению липидов, стимулирующий развитие неалкогольной жировой болезни печени [166]. Однако, ИЛ-4 остается чрезвычайно загадочным цитокином в контексте жировой ткани.

### **1.3.2.Интерлейкин-4 и жировая ткань**

Как было сказано выше, перспективной терапевтической стратегией коррекции ИР, ассоциированной с латентным воспалением жировой ткани, является активация естественных противовоспалительных сигнальных каскадов. ИЛ-4 является непосредственным активатором STAT6-зависимого

противовоспалительного сигнального каскада, запускающего экспрессию противовоспалительных генов. Первые попытки коррекции ИР с использованием противовоспалительных цитокинов были предприняты в 2010 году группой профессора A.Chawla [167]. В ходе цикла работ, посвященных действию противовоспалительных цитокинов в модели высокожировой диеты, было блестяще показано позитивное действие на инсулиновую чувствительность животных [168-170]. Серией последовательных кондиционных нокаутов был установлен путь, по которому ИЛ-4 воздействует на углеводный метаболизм: ИЛ-4 регулирует секрецию противовоспалительных цитокинов ВЛК 2 типа, эозинофилами и M2-макрофагами, активирует миелоидную тирозингидроксилазу макрофагов, которые секретируют инсулин и паракринно активируют формирование бежевых адипоцитов, которые обладают способностью к термогенезу и секреции противовоспалительных цитокинов [38].

Несмотря на успехи в области использования ИЛ-4 для коррекции ИР, было непонятно, осуществляет ли ИЛ-4 какое-либо воздействие на зрелые адипоциты. На момент 2017 года существовало только 2 работы, описывающих действие ИЛ-4 на зрелые адипоциты, и обе они сходились в выводах, что ИЛ-4 регулирует активность преадипоцитов, но не зрелых адипоцитов [171, 172]. Однако, в 2017-2018 году появилось 2 работы, результаты одной из которых представлены в данной диссертации, свидетельствующие о том, что ИЛ-4 способен регулировать инсулиновую чувствительность зрелых адипоцитов в отсутствие других типов клеток [173, 174]. Тем не менее, механизм непосредственного действия ИЛ-4 на зрелые адипоциты остается неясным, и одной из задач данной работы было изучение механизма действия ИЛ-4 на зрелые адипоциты.

#### ***1.4.Генная терапия***

Генная терапия направлена на лечение заболеваний с использованием внесения одной или нескольких терапевтических нуклеиновых кислот в клетки

пациента или путем исправления дефектных генов с помощью, например, систем редактирования генома. Генная терапия имеет потенциал для лечения ранее неизлечимых болезней ( $\beta$ -талассемия, миодистрофия Дюшена и т.д.), а также для совершенствования терапии социально-значимых заболеваний (инфаркт миокарда, СД2Т и т.д.). Успешное лечение офтальмологических заболеваний и первичных иммунодефицитов способствовало интенсивному развитию данной области и было подчеркнуто как одно из основных научных достижений года журналом Science в 2009 году [175, 176]. Достижения в области векторных систем для генной терапии, оптимизированных для использования *in vivo* и *ex vivo*, накопление клинического опыта использования этих технологий стали основными факторами, которые в конечном счете позволили генной терапией за рубежом стать рутинно используемым методом в клинической практике, особенно в области онкологии [177].

Эффективные стратегии клинической генной терапии основаны либо на доставке гена *in vivo* в постмитотические клетки-мишени, либо на *ex vivo* доставке генов в аутологичные клетки, за которыми следует перенос модифицированных клеток обратно пациенту. В *in vivo* генной терапии наибольший успех продемонстрировали плазмидные конструкции и аденоассоциированные вирусы (ААВ). Успешность применения плазмидных конструкций обуславливает их легкость производства, а также эпизодическая доставка генетического материала. Успешность применения ААВ обусловлена также эпизодической доставкой генетического материала и высоким разнообразием серотипов и вариантов капсидов, что позволяет использовать ААВ для таргетной генной терапии *in vivo*. *Ex vivo* генная терапия в первую очередь была направлена на доставку генов в аутологичные гематopoэтические стволовые клетки (лечение гематологических патологий), а также в дифференцированные клетки (Т-лимфоциты). Для *ex vivo* генной терапии применяются преимущественно лентивирусы, которые показывают лучший доклинический профиль безопасности и более высокую эффективность

доставки генов в неделящиеся клетки, по сравнению с гамма-ретровирусами. Тем не менее, лентивирусные конструкции также используются для экспериментальных работ в области генной терапии, так как лентивирусы обладают наивысшей эффективностью заражения неделящихся клеток, по сравнению с остальными вирусными векторами. Далее в обзоре мы рассмотрим основные преимущества и недостатки использования двух основных видов генной терапии для коррекции заболеваний жировой ткани.

#### **1.4.1. Плазмидная генная терапия**

Плаزمида является простейшей формой вектора для транспорта ДНК в ядро клетки. Плазмида представляет собой кольцевую двуцепочечную ДНК, длина варьируется от 1000 до 200000 п.о. В природе плазмиды обнаруживаются практически у всех видов бактерий, где они обычно кодируют белки устойчивости к антибиотикам. В общем виде плазмида для использования в генной терапии несет ген для устойчивости к антибиотикам, регулируемый прокариотическим промотором; прокариотический ориджин репликации, поддерживающий экспрессию плазмиды; кассета экспрессии, содержащая промотор для инициации транскрипции трансгена, кодирующего терапевтический белок, сам трансген и сигнал полиаденилирования, необходимый для ядерного экспорта мРНК [178]. Большинство плазмид содержат только один трансген, но полицистронные экспрессионные кассеты могут кодировать несколько целевых белков без существенных ограничений по размеру кассеты. По сравнению с рекомбинантными вирусными векторами, плазмиды просты в производстве и легко получают в больших количествах. Плазмиды имеют отличный профиль безопасности, низкую иммуногенность, вероятность канцерогенеза крайне мала (геномная интеграция крайне неэффективна). Плазмиды обладают очень большой емкостью для упаковки ДНК и могут использоваться для размещения больших фрагментов геномной ДНК. Плазмиды легки в клиническом использовании, оставаясь стабильными при комнатной температуре. Однако, при работе с плазмидами есть несколько

существенных ограничений, среди которых основные - крайне низкоэффективная доставка гена, а также отсутствие возможности использовать таргетную доставку гена, за исключением местного применения, например, в офтальмологии [179].

В современной диабетологии ведутся работы по созданию плазмидных генно-терапевтических препаратов для лечения СД2Т. Среди основных генов-мишеней - глюкагон-подобный пептид 1 типа (ГПП-1), компонент инкретиновой системы со многими антидиабетическими эффектами: снижение веса, снижение активности желудка, рост секреции инсулина, дифференцировка новых beta-клеток и т.д. [180-182]; адипонектин, адипокин, обладающий антидиабетическим, противовоспалительным и кардиопротективным действиями [183-185]. Плазмидная экспрессия ГПП-1 активно используется для коррекции СД2Т в животных моделях и планируется к выходу на клинические испытания в 2018-2020 годах [186-188]. Однако, использование генно-терапевтических аналогов ГПП-1 не выглядит крайне перспективным в связи с тем, что в настоящее время существуют препараты на основе лираглутида - химического аналога ГПП-1, которые действуют системно и обладают хорошим антидиабетическим действием, а также способствуют снижению веса [189-191]. Иными словами, генно-терапевтический ГПП-1 на настоящий момент не имеет существенных преимуществ перед препаратами на основе лираглутида. Тем не менее, интересным направлением в этой области выглядит применение генной терапии с использованием регуляторов природной экспрессии ГПП-1. Существуют работы по генной терапии с использованием эксендина-4, нативного стимулятора экспрессии ГПП-1; применение плазмидной генной терапии на основе эксендина-4 значительно улучшает показания инсулиновой чувствительности животных [192].

Использование в качестве антидиабетических препаратов плазмид с геном адипонектина выглядит более перспективным направлением, так как

адипонектин обладает комплексным системным антидиабетическим, противовоспалительным и кардиопротективным действием. Плазмидная генная терапия с использованием гена адипонектина обладает позитивными эффектами на инсулиновую чувствительность, секрецию инсулина, а также уровень системного воспаления [193-195]. Основная проблема плазмидной генной терапии с использованием гена адипонектина - низкая эффективность сборки эффекторного высокомолекулярного адипонектина. С гена адипонектина экспрессируется низкомолекулярная форма адипонектина, которая затем в адипоцитах претерпевает олигомеризацию с формированием высокомолекулярной формы адипонектина, которая и реализует антидиабетические и кардиопротективные эффекты адипонектина. Несмотря на это, плазмидная терапия с использованием гена адипонектина является перспективной стратегией для коррекции СД2Т.

Плазмидная генная терапия невозможна для использования антидиабетического потенциала гена ИЛ-4. Основная причина - большое количество побочных эффектов ИЛ-4, поэтому системное применение ИЛ-4 как в виде рекомбинатного белка, так и в виде плазмиды невозможно. Среди побочных эффектов ИЛ-4: профибротическая [196], иммуносупрессивная [197] и онкогенная активности [198]. В связи с этим, необходимо разрабатывать таргетную стратегию применения ИЛ-4 в жировой ткани для коррекции ИР.

#### **1.4.2. Вирусная генная терапия**

Как было обсуждено ранее, для вирусной генной терапии используется 2 основных типа вирусных векторов: лентивирусы и адено-ассоциированные вирус (ААВ). Лентивирусы используются в основном для исследовательских целей, в животных моделях и для *ex vivo* терапии. ААВ используются в основном для *in vivo* переноса генов в клетки. Тем не менее, использование ААВ векторов имеет ряд проблем, среди которых низкая эффективность сборки вирусных частиц, а также существенные ограничения на размер вставки (не более 3500 пар оснований). Лентивирусы обладают значительно более высокой

эффективностью сборки вирусных частиц, заражения неделящихся клеток, к которым относятся и адипоциты, а также более значительным объемом вставки (до 9000 пар оснований).

Вирусные вектора в генной терапии позволяют использовать таргетную доставку с использованием тканеспецифичных промоторов, вирусов разной тропности, а также вставлением касет антисмысловых олигонуклеотидов к микроРНК неспецифично трансдуцируемых тканей. Данные подходы успешно реализуются в экспериментальных статьях, применительно к жировой ткани [199-201].

Среди используемых таргетных генов в аденоассоциированных вирусных векторах для коррекции СД2Т: ГПП-1 и лептин. Потенциал таргетной генной терапии с использованием гена ГПП-1 для стимуляции регенерации бета-клеток островков Лангерганса во время тяжелых поражений поджелудочной железы при длительном СД2Т чрезвычайно высок [202]. Помимо этого используется системное вирусное введение ГПП-1, что улучшает инсулиновую чувствительность животных [203, 204], однако, как говорилось выше, данный подход не имеет существенных преимуществ перед фармакологическими аналогами ГПП-1. Другой важной мишенью для системной генной терапии является адипокин лептин, который обладает анорексигенным и термогенным действиями, снижая вес и улучшая инсулиновую чувствительность. Так как лептин является гормоном жировой ткани, действующим системно, то системная вирусная генная терапия с использованием гена лептина демонстрирует позитивные эффекты на регуляцию инсулиновой чувствительности животных [205, 206].

Применение гена ИЛ-4 в таргетной вирусной терапии СД2Т может реализовываться с использованием нескольких уровней таргетности доставки. В случае использования ААВ векторов, обладающих тропностью к жировой ткани (8 и 9 серотипы ААВ), в сочетании с адипо-специфичными промоторами (промоторы адипонектина, FABP4 и т.д.) и антисмысловыми каскетами к

микроРНК неспецифически трансдуцируемых данными серотипами ААВ тканям (антисмысловые кассеты к микроРНК, специфичным для кардиомиоцитов и гепатоцитов), можно достичь максимальной специфичности введения гена ИЛ-4 в адипоциты для коррекции латентного воспаления и ИР жировой ткани.

### ***1.5. Заключение***

В заключение данного обзора, стоит отметить, что генно-терапевтический подход является одним из оптимальных для коррекции иммунофенотипа жировой ткани, а также латентного воспаления, которые являются важнейшими причинами развития ИР жировой ткани и последующего СД2Т. Таргетное введение генов противовоспалительных цитокинов в зрелые адипоциты позволит регулировать уровень воспаления самих адипоцитов, стимуляцию дифференцировки белого жира в бежевый, а также термогенную активность жира, которая позволит снижать объем жировой ткани. Помимо этого, экспрессия противовоспалительных цитокинов адипоцитами позволит с помощью паракринного воздействия на резидентные и привлеченные клетки иммунной системы сдвигать иммунофенотип жировой ткани в сторону противовоспалительного направления, поддерживающего гомеостаз жировой ткани. Таким образом, регуляция воспалительного статуса адипоцитов с помощью генной терапии является перспективным фундаментальным направлением для разработки новых подходов в коррекции ИР и терапии СД2Т.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### *2.1. Клиническая характеристика пациентов, включенных в исследование*

Для исследования ИР-ассоциированных изменений в иммунофенотипе жировой ткани, а также в свойствах МСК ЖТ, было проведено исследование с использованием клинического материала пациентов. Работу по отбору пациентов и получению клинических данных выполнили врачи-эндокринологи Скляник И.А., Паневина А.С. и к.м.н. Шестакова Е.С. под руководством д.м.н., академика РАН Шестаковой М.В. Исследование было инициировано в 2017 году и протокол исследования был утвержден на заседании этического комитета Национального Медицинского Исследовательского Центра Эндокринологии Минздрава РФ (протокол №9 от 10 мая 2017 года). Критерии включения пациентов в исследование: ожирение II-III степени ( $ИМТ > 35 \text{ кг/м}^2$ ) с длительным течением (более 15 лет). Критерии исключения пациентов: возраст менее 18 лет, наличие любых других типов сахарного диабета, наличие воспалительного процесса, наличие онкологического процесса, беременность. В исследование были включены 10 пациентов, отобранных в соответствии с критериями включения и исключения; из 10 пациентов 5 имели нормальную глюкозную толерантность, 5 имели установленный диагноз сахарного диабета 2 типа. Пациенты с нормальной глюкозной толерантностью не получали антидиабетической терапии. Пациенты с СД2Т получали следующую терапию: метформин ( $n=4$ ), ингибиторы дипептидилпептидазы 4 типа ( $n=4$ ), сульфонилмочевина ( $n=2$ ), ингибиторы натрий/глюкозного котранспортера 2 типа ( $n=1$ ). При включении в исследование пациентов госпитализировали в отделение терапии диабета с референс-центром обучения Института Диабета Национального Медицинского Исследовательского Центра Эндокринологии Минздрава РФ. На базе отделения проводили оценку стандартных клинических показателей пациентов, среди которых были: пол, возраст, ИМТ, НОМА-IR индекс, М-индекс, уровень глюкозы крови натощак, уровень гликированного

гемоглобина. Оценку уровня глюкозы крови натощак проводили с использованием клинического анализатора Architect C4000 (Abbott Diagnostics, США) на основе стандартных наборов, предлагаемых производителем. Оценку уровня гликированного гемоглобина проводили с использованием системы высокоэффективной жидкостной хроматографии D-10 Hemoglobin Testing System (Bio-Rad, Франция). HOMA-IR индекс оценивали в онлайн режиме с использованием расчетной программы «HOMA-IR calculator» (<https://www.mdcalc.com/homa-ir-homeostatic-model-assessment-insulin-resistance>). Оценку M-индекса проводили на базе лаборатории клэмп-технологий Национального Медицинского Исследовательского Центра Эндокринологии Минздрава РФ с использованием гиперинсулинемического эугликемического клэмп-теста на основе классического протокола DeFronzo и соавторов [207]. Пациенту устанавливают 2 периферических катетера, после чего с использованием одного катетера проводят клэмп-тест, а второй катетер используется для непрерывного контроля гликемии пациента. Клэмп-тест включает в себя создание гиперинсулинемии путем непрерывного введения с постоянной скоростью 1 мЕд/кг/мин раствора инсулина с концентрацией 100 мкЕд/мл с использованием волюметрического инфузионного насоса Infusomat FMS (B Braun, Германия). Цель создания гиперинсулинемии - отключение секреции собственного инсулина поджелудочной железой, а также блокирование глюконеогенеза в печени. Одновременно с инфузией инсулина, проводили инфузию 20% р-ра глюкозы с переменной скоростью, чтобы для поддержания физиологического уровня глюкозы крови. Уровень глюкозы крови измеряли каждые 5-10 минут с использованием глюкометра OneTouchVerioPro+ (LifeScan, Швейцария). Целевые уровни глюкозы крови составляли 5.1-5.6 мМ. Если уровень глюкозы крови снижался, то скорость инфузии раствора глюкозы увеличивалась и, соответственно, наоборот. В течение примерно 120-180 минут достигалось динамическое равновесие, которое обозначало, что скорость инфузии глюкозы в настоящий момент равна

скорости ее поглощения тканями. При сохранении целевых значений уровня глюкозы крови при постоянной скорости инфузии глюкозы в течении 30-40 минут, данную концентрацию считали за скорость поглощения глюкозы тканями и использовали для расчета М-индекса. Результаты были выражены как значения М-индекса (мг/кг/мин) и классифицировались следующим образом: М = 0-2 - тяжелая ИР, М = 2-4 - умеренная ИР, М = 4-6 - мягкая ИР, М > 6 и выше - отсутствие ИР.

После выполнения клинической характеристики углеводного обмена, пациентов переводили в отделения бариатрической хирургии на базе многопрофильных клиник Центр Эндохирургии и Литотрипсии, Национальный Медицинский Исследовательский Центр Акушерства, Гинекологии и Перинатологии Минздрава РФ, а также в хирургическое отделение Центральной Клинической Больницы №1 ОАО Российские Железные Дороги. В отделениях пациентам выполняли бариатрические операции (билиопанкреатическое шунтирование, рукавная гастропластика), в ходе которых осуществляли забор подкожной жировой ткани из области подкожной жировой клетчатки живота, а также забор сальниковой жировой ткани из области большого сальника. Перед операцией проводили забор 50 мл крови больных для получения образцов аутологичной сыворотки. Биоптаты жировой ткани помещали в раствор Хэнкса (ПанЭко, Россия), после чего перевозили кровь и биоптаты жировой ткани на леду в Национальный Медицинский Исследовательский Центр Кардиологии Минздрава РФ, где выполняли дальнейшие эксперименты.

## ***2.2. Иммуногистохимическое исследование биоптатов жировой ткани пациентов***

Для оценки морфологии и иммунофенотипа жировой ткани пациентов с ожирением и наличием/отсутствием СД2Т проводили иммуногистохимическое исследование срезов жировой ткани пациентов. Фрагменты жировой ткани отбирали от биоптатов, полученных в ходе бариатрических операций, после

чего помещали их в среду для заморозки тканей O.C.T.Tissue Tek (Sakura, Япония) и подвергали послойной заморозке в жидком азоте. Замороженные иммуногистохимические блоки хранили при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$ . Приготовление срезов осуществляли с использованием криотома Microm (ThermoScientific, Германия) при температуре  $-28^{\circ}\text{C}$ ; толщина срезов для оценки морфологии жировой ткани составила 30 мкм, толщина срезов для иммуногистохимического окрашивания составила 12 мкм. Полученные срезы адгезировали на предметные стекла SuperFrost (ThermoScientific, Германия) и хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Для оценки морфологии жировой ткани, срезы размораживали при комнатной температуре в течение 1 часа, после чего фиксировали срезы в течение 20 минут в ледяной смеси ацетона с метанолом в соотношении 1 к 1. В дальнейшем срезы трижды промывали водой, после чего выполняли проводку по спиртам в этаноле (концентрации 96%-96%-99%(надкупоросный спирт)) и дегидратацию срезов в ксилоле в течение 1 часа. Стекла высушивали и заключали срезы в реагенте CytoSeal (ThermoScientific, Германия). В дальнейшем выполняли световую микроскопию срезов на микроскопе Zeiss Axio Observer A1 (Zeiss, Германия) с последующим вычислением средней площади адипоцита в программе ImageJ с использованием плагина SetScale.

Для оценки иммунофенотипа жировой ткани, срезы размораживали при комнатной температуре в течение 1 часа, после чего фиксировали срезы в течение 20 минут в ледяном ацетоне. В дальнейшем срезы подсушивали, трижды промывали ФСБ и проводили забивку срезов с использованием 10% раствора сыворотки доноров вторых антител во влажной камере в течение 1 часа при комнатной температуре. После забивки срезы стряхивали от жидкости и без промывки наносили раствор первых антител, с которым проводили инкубацию во влажной камере в течение ночи при  $4^{\circ}\text{C}$ . Используемые в исследовании первичные антитела: анти-CD68-антитело, #ab955, Abcam, США; анти-CCR7-антитело, #32527, Abcam, США; анти-CD206-антитело, #ab64693,

Abcam, США. После окраски первичными антителами срезы трижды промывали в ФСБ и окрашивали вторичными антителами во влажной камере в течение 1 часа при комнатной температуре. Используемые в исследовании вторичные антитела: антитела осла против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с красителем AlexaFluor488, #A21206, Molecular Probes, США; антитела козы против иммуноглобулинов мыши, конъюгированные с красителем AlexaFluor594, #A21203, Molecular Probes, США. После этого срезы трижды промывали ФСБ, в процессе чего проводили окрашивание ядерным красителем DAPI (Sigma-Aldrich, США). После полной промывки срезы промывали в дистиллированной воде и заключали в AquaPolyMount (PolySciences, США). Срезы высушивали в темноте в течение двух дней, после чего проводили флуоресцентную микроскопию на микроскопе Zeiss Axio Observer A1 (Zeiss, Германия) с последующим вычислением процента инфильтрации жировой ткани общей популяцией макрофагов, а также содержанием M1- и M2-макрофагов в общей популяции макрофагов в программе ImageJ с использованием плагина CellCounter. Общая популяция макрофагов представляла собой CD68<sup>+</sup>-клетки, M1-макрофаги - CCR7<sup>+</sup>CD68<sup>+</sup>-клетки, M2-макрофаги - CD206<sup>+</sup>CD68<sup>+</sup>-клетки.

### ***2.3. Выделение МСК ЖТ из жировой ткани пациентов***

Для оценки состояния прогениторных клеток жировой ткани при развитии латентного воспаления и ИР жировой ткани осуществляли выделение МСК ЖТ пациентов. Биоптаты подкожной и сальниковой жировых тканей, доставленных в Национальный Медицинский Исследовательский Центр Кардиологии Минздрава РФ, помещали в стерильные условия ламинарного бокса. Биоптаты помещали на чашки Петри с 5 мл среды DMEM LG (Gibco, США), и осуществляли выделение фрагментов чистой жировой ткани, отделяя следы коагулятора, использующегося при операции; сосуды; фрагменты соединительной ткани. Отобранные фрагменты очищенной жировой ткани измельчали сосудистыми ножницами до консистенции суспензии мелких

кусочков, после чего суспензию переносили в пробирку и добавляли равные объемы коллагеназы I типа (200 ед/мл, Sigma-Aldrich, США) и диспазы (30 ед/мл, Invitrogen, США), итоговое соотношение объема ткани (в мл) к объему ферментативного раствора должно составить 1 к 2. Полученную смесь инкубировали в течение одного часа при 37°C и постоянном перемешивании. По окончании инкубации к смеси ткани и ферментов добавляли равный объем среды DMEM HG + 15% FBS и центрифугировали при 200g в течении 15 минут. После центрифугирования фракцию флоттирующего жира и супернатант отбирали, осадок ресуспендировали в среде DMEM + 10% FBS, после чего фильтровали через нейлоновые фильтры с диаметром пор 40 мкм BD Falcon Cell Strainer (BD Biosciences, США). Отфильтрованную суспензию центрифугировали при 200g в течение 10 минут. Супернатант отбирали, осадок ресуспендировали в среде DMEM HG + 10% FBS, с добавлением 100 Ед пенициллин/стрептомицина, после чего высаживали на чашки из расчета 10 мл суспензии на 1 культуральную чашку диаметром 10 см. Выделенные клетки культивировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Через 48 часов после высевания клетки промывали от эритроцитов и неприкрепившихся клеток, после чего получали МСК ЖТ нулевого пассажа. Далее смену среды проводили каждые 2-3 дня, при достижении 80% конfluenceности клетки рассаживали в соотношении 1 к 4.

#### ***2.4. Культивирование, заморозка и адипогенная дифференцировка МСК ЖТ пациентов***

МСК ЖТ пациентов культивировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> в культуральном инкубаторе Binder (Binder, Германия). Основная среда культивирования - DMEM HG (Gibco, США) + 10% FBS (HyClone, США). При переходе клеток в покоящийся распластаный фенотип, дальнейший рост культуры стимулировали культивированием в смеси сред DMEM HG + 10% FBS и EGM (Lonza, США) в соотношении 1 к 1. При достижении 80% конfluenceности МСК ЖТ пересевали в соотношении 1 к 4. Для посева чашки промывали дважды ледяным раствором Версена (ПанЭко, Россия), после чего клетки

открепляли от культуральных чашек 0.25% р-ром трипсина (Gibco, США). Клеточную суспензию центрифугировали при 200g в течение 10 минут, после чего супернатант, содержащий трипсин, отбирали, а клетки заливали свежей средой, ресуспендировали и высаживали на культуральные чашки. Эксперименты с культурой МСК ЖТ начинали с 3 пассажа, так как на стадии 1 и 2 пассажей происходит селекция культуры от клеток эндотелия и мезотелия.

Для заморозки МСК ЖТ пациента отбирали 1 млн. клеток, которые ресуспендировали в растворе для заморозки: 10% ДМСО + 90% аутологичной сыворотки пациента. Осуществляли заморозку клеток в изопропанольной камере на  $-70^{\circ}\text{C}$ , после чего клетки переносили на долгосрочное хранение в пары жидкого азота.

Для исследования воспаления и инсулиновой сигнализации проводили дифференцировку МСК ЖТ в зрелые адипоциты, используя набор реактивов «Mesenchymal STEM Cell Adipogenesis Kit» (Merck Millipore, Германия). Культуру МСК ЖТ снимали с культуральных чашек, центрифугировали при 200g в течение 10 минут, отбирали супернатант. Клеточный осадок ресуспендировали в среде предкультивирования Mesenchymal Stem Cell Expansion Medium (88% DMEM LG, 1% L-глутамин, 10% FBS, 1% пенициллин/стрептомицин) до концентрации 60000 кл/мл. Затем, клеточную суспензию высаживают в подходящий формат культуральной посуды и доращивают в стандартных условиях культивирования до конfluence 90-100%, после чего индуцируют адипоцитарную дифференцировку. Для этого аспирируют кондиционированную Mesenchymal Stem Cell Expansion Medium и аккуратно добавляют Adipogenesis Induction Medium (88% DMEM LG, 10% FBS, 1 мкМ дексаметазон, 0.5 мкМ изобутилметилксантин, 10 мкг/мл инсулин, 100 мкМ индометацин, 1% L-глутамин, 1% пенициллин/стрептомицин). Далее среды заменяют каждые два дня, чередуя среды Adipogenesis Induction Medium и Adipogenesis Maintenance Medium (88% DMEM LG, 1% L-глутамин, 10% FBS, 1% пенициллин/стрептомицин, 10 мкг/мл инсулин). На 21 день проводили

окрашивание клеток красителем OilRedO для выявления зрелых адипоцитов, а также лизис клеток и выделение из них тотальной РНК, что будет описано ниже.

### ***2.5. Оценка пролиферации МСК ЖТ пациентов***

Оценку одного из основных регенеративных параметров МСК ЖТ проводили с использованием метода МТТ. Для этого МСК ЖТ высевали в 96-луночные культуральные планшеты (5000 клеток на лунку) в среде DMEM + 10% FBS в конечном объеме 100 мкл. Для преобразования измерений абсорбции в эквивалентные количества клеток была построена калибровочная кривая на основе 6 последовательных разведений в диапазоне 620-20000 клеток на лунку. Клетки инкубировали в течение 24, 48, 72 и 96 часов соответственно, пролиферацию клеток оценивали после добавки 20 мкл 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-диметилтетразолийбромида (2.5 мг/мл), с последующей инкубацией в течение 4 часов. Образовавшиеся кристаллы пурпурного формазана солюбилизировали в изопропиловом спирте при комнатной температуре в течение 20 минут, после чего измеряли поглощение растворов при длине волны 595 нм на планшетном фотометре Multiscan Microplate Reader (Labsystems, США) с последующим расчетом количества клеток в лунке. Оценку пролиферации проводили в ответ на стимуляцию клеток 10%FBS. Для этого все клетки за сутки до стимуляции культивировали на бессывороточной DMEM NG, после чего контрольные клетки оставались нестимулированными, а к экспериментальным клеткам добавляли 10%FBS. По результатам эксперимента вычисляли индекс пролиферации, который является отношением количества клеток в лунке, стимулированной FBS, и количества клеток в лунке без добавления FBS. Индекс пролиферации по результатам МТТ является косвенным показателем увеличения количества жизнеспособных клеток.

### ***2.6. Оценка распределения по фазам клеточного цикла МСК ЖТ пациентов***

Оценку распределения МСК ЖТ пациентов по фазам клеточного цикла в ответ на действие FBS проводили с использованием йодистого пропидия. FBS, как и в разделе 2.5, выступал в качестве активатора пролиферации. Метод основан на способности йодистого пропидия стехиометрически связываться с различными формами ДНК и выдавать пики разной интенсивности флуоресценции. Так, самой низкой интенсивностью флуоресценции обладает фракция ДНК с количеством молекул 2с, что соответствует клеткам в G0 фазе, самой высокой - фракция ДНК с количеством молекул 4с, что соответствует клеткам в G2/M фазе. Промежуточная интенсивность флуоресценции соответствует клеткам в S-фазе. В качестве оценочного параметра использовали фракцию метаболически активных клеток - сумма клеток в G2/M и S фазах, которую обозначали, как клетки в G2/S фазе. Для оценки активации пролиферативного ответа клетки депривировали в течении суток в бессывороточной DMEM HG, после чего одну часть клеток стимулировали добавлением 10%FBS на 24 часа, а вторую оставляли в бессывороточной среде на 24 часа. Оценку распределения МСК ЖТ по фазам клеточного цикла выполняли с помощью набора реактивов Propidium Iodide Flow Cytometry Kit (ab139418, Abcam, США). После 24-часовой инкубации клетки снимали с культуральной посуды фиксировали в ледяном 70% этаноле в течение 4 часов. Затем проводили процедуру денатурации ДНК путем обработки клеток 2N HCl с 0.5% Triton-X100. В дальнейшем раствор кислоты нейтрализовали до pH 8.5 с помощью 0.1M боратного буфера. Клетки промывали PBS и ресуспендировали в растворе йодистого пропидия (концентрация раствора 50 мг/мл) с добавлением 550 Ед/мл RNКазы А. Окрашенные клетки анализировали с использованием проточного цитометра FACS Canto II (BD Pharmingen, США). Обработку результатов производили в программе FlowJo. Для оценки активации пролиферации проводили сравнение количества клеток в G2/S фазе в популяциях без добавления FBS и с добавлением 10%FBS.

### ***2.7.Выделение фракции тотальной РНК***

Для выделения тотальной РНК из клеток использовали набор реактивов RNEasy Mini Kit (Qiagen, США). Лизис клеток выполняли на лунке культурального планшета буфером RLT с добавлением 1% меркаптоэтанола. Клеточный лизат собирали с помощью культурального скребка, после чего переносили лизат в стерильный эппендорф. Полученный лизат гомогенизировали инсулиновым шприцем с диаметром иглы 29G, после чего добавляли к гомогенизированному лизату равный объем 70% этанола, тщательно перемешивая полученную суспензию. Полученную смесь переносили на хроматографическую колонку RNEasy Spin Column на 2 мл пробирке, после чего центрифугировали 15 с при 8000g. Затем на колонку добавляли 700 мкл буфера RW1 для промывки колонки и проводили центрифугирование при 8000g в течение 15 с. Затем для повторной промывки колонки наносили 500 мкл буфера RPE и проводили центрифугирование при 8000g в течение 15 с, после чего повторяли нанесение буфера RPE в объеме 500 мкл и проводили центрифугирование при 8000g в течение 2 минут для отмывки остаточного этанола. Промытую хроматографическую колонку переносили на пустую пробирку, затем проводили центрифугирование без нанесения растворов при 8000g в течение 1 минуты. Затем колонку помещали на стерильный эппендорф, наслаивали 30-50 мкл стерильной воды, свободной от РНКаз, и осуществляли элюцию РНК с колонки путем центрифугирования при 8000g в течение 1 минуты. Концентрацию полученной РНК и ее чистоту (определяли по соотношению поглощения раствора при 260 нм (поглощение РНК) и поглощения раствора при 280 нм (поглощение белка)) определяли с использованием микрообъемного спектрофотометра NanoDrop2000 (ThermoScientific, США).

### ***2.8. Проведение количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени***

Для получения тотальной кДНК использовали набор реактивов RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoScientific, США). Для

получения кДНК готовили смесь из препарата тотальной РНК с известной концентрацией и стерильной воды, из расчета общего объема смеси 11 мкл и суммарного количества РНК в смеси - 1 мкг. К полученному раствору добавляли олиго-dT-праймер в объеме 1 мкл, после чего инкубировали полученную смесь в течение 5 минут при 70°C для отжига праймера. В процессе отжига готовили смесь из 5-кратного реакционного буфера в объеме 4 мкл на пробу, 10 mM р-ра dNTP в объеме 2 мкл на пробу и RiboLock Ribonuclease Inhibitor в объеме 1 мкл на пробу. После отжига смесь из РНК и олиго-dT-праймера охлаждали, центрифугировали на настольной центрифуге BioSan, после чего добавляли к ней смесь из реакционного буфера, dNTP и ингибитора РНКаз. Суммарную смесь инкубировали в течение 5 минут при 37°C, после чего добавляли в пробу обратную транскриптазу RevertAid H Minus M-MuLV RT в объеме 1 мкл и инкубировали смесь при 42°C в течение 60 минут для элонгации кДНК. Терминацию реакции осуществляли инкубацией при 70°C в течение 10 минут, продукты реакции помещали на лед и хранили при -20 С.

Для проведения ПЦР в реальном времени использовали набор реактивов для ПЦР в реальном времени, краситель SYBR Green (Синтол, Россия). Реакцию проводили в автоматической ПЦР-системе StepOnePlus (AppliedBiosystems, США) в формате 96-луночного планшета с компьютерной регистрацией данных. В пробу брали 1 мкл р-ра кДНК, по 0.1 мкл прямого и обратного праймеров с концентрацией 100 мкМ, 10 мкл 2.5-кратного реакционного буфера, 13.8 мкл деионизованной воды. ПЦР проводили по следующей схеме: общее плавление (10 минут при 95°C), 40 циклов плавления (95°C, 15 с) и отжига (60°C, 1 мин), элонгация проходила также при 60°C с участием специфической полимеразы, после чего проводили определение кривых плавления ПЦР-продуктов. Расчет относительной экспрессии проводили по методу Comparative Ct [208], контрольную пробу принимали за 100%, изменения экспрессии генов считали относительно контрольной пробы.

## 2.9. Оценка адипогенной дифференцировки МСК ЖТ пациентов

Для анализа способности МСК ЖТ формировать новые жировые депо, проводили адипогенную дифференцировку МСК ЖТ, как описано в разделе 2.4. На 21 день адипогенной дифференцировки проводили окрашивание клеток липофильным красителем OilRedO. Кондиционированную среду аспирировали с клеточной культуры и проводили фиксацию в течение 30 минут 4% р-ром формальдегида. Фиксированные клетки трижды промывали PBS, после чего прокрашивали клетки в течение 50 минут раствором красителя OilRedO. После прокраски клетки отмывали дистиллированной водой, а затем прокрашивали в течение 15 минут раствором гематоксилина. Краситель аспирировали из лунок, отмывали клетки дистиллированной водой, после чего проводили световую микроскопию.

В качестве дополнительного метода оценки адипогенной дифференцировки проводили ПЦР в реальном времени на ряд генов-маркеров адипоцитов: *GLUT4*, *PPARgamma*, *FABP4*. ПЦР в реальном времени проводили как описано в разделе 2.8. В Таблице 1 представлены последовательности праймеров, используемых в ПЦР.

Таблица 1. Праймеры для оценки адипогенной дифференцировки МСК ЖТ

Ген	Прямой праймер 5'-3'	Обратный праймер 5'-3'
hGLUT4	CGTCTCCATTGTGGCCATCT	CCCATAGCCTCCGCAACATA
hPPARg	TCAAAGTGGAGCCTGCATCT	TGAGACATCCCCACTGCAAG
hFABP4	GCACCATAACCTTAGATGGGGG	GTGACGCSTTTCATGACGC
hGAPDH	CTCATTTCTGGTATGACAACGA	CTTCCTCTTGTGCTCTTGCT

## 2.10. Культивирование преадипоцитов мыши 3T3-L1 и их адипоцитарная дифференцировка

Культуру преадипоцитов 3T3-L1 культивировали в стерильных условиях при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> в инкубаторе Binder (Binder, Германия) в среде DMEM HG с добавлением 2 mM L-глутамина, 100 ед/мл пенициллин/стрептомицина и 10%

FBS. При достижении 80% конfluenceности 3T3-L1 пересевали в соотношении 1 к 4. Для посева чашки промывали дважды ледяным раствором Версена (ПанЭко, Россия), после чего клетки открепляли от культуральных чашек 0.25% р-ром трипсина (Gibco, США). Клеточную суспензию центрифугировали при 200g в течение 10 минут, после чего супернатант, содержащий трипсин, отбирали, а клетки заливали свежей средой, ресуспендировали и высаживали на культуральные чашки.

Адипоцитарную дифференцировку 3T3-L1 выполняли по протоколу Zebisch и соавторов [209]. Для этого 3T3-L1 доращивали до конfluenceности 90-100%, после чего заменяли среду на DMEM HG + 10% NBCS (дни 0-2). На день 3 среду заменяли на DMEM HG + 10% FBS с добавлением 0.5 мМ дексаметазона, 0.25 мкМ изобутилметилксантина, 2 мкМ розиглитазона и 1 мкг/мл инсулина. В описанной среде клетки культивировали еще 2 дня (дни 5-7), после чего среду заменяли на DMEM HG + 10% FBS + 1 мкг/мл инсулина (дни 7-9). С дня 9 по день 14 культивирование осуществляли на стандартной среде DMEM HG + 10% FBS. На 14 день оценивали эффективность адипоцитарной дифференцировки с помощью окраски липофильным красителем OilRedO, а также с помощью ПЦР с обратной транскрипцией в реальном времени на маркеры адипоцитарной дифференцировки, с 14 дня клетки использовали в экспериментах.

Таблица 2. Праймеры для оценки адипогенной дифференцировки 3T3-L1

Ген	Прямой праймер 5'-3'	Обратный праймер 5'-3'
mGLUT4	AGAGAGAGCGTCCAATGTCC	ACTAAGAGCACCGAGACCAAC
mPPAR $\gamma$	TCTCAGAGGGCCAAGGATTC	GCAGCAGGTTGTCTTGGATG
mADIPOQ	CTTGGTCCTAAGGGTGAGACAG	AGTGCTGCCGTCATAATGATTC
mGAPDH	CGACTTCAACAGCAACTCCCACTCTTCC	TGGGTGGTCCAGGGTTTCTTACTCCTT

## **2.11. Моделирование метаболического стресса на зрелых адипоцитах 3T3-L1**

Для получения релевантной модели инсулиновой резистентности (для дальнейших исследований потенциальных корректирующих воспалительный статус адипоцитов агентов) проводили моделирование ИР различными способами: липид-зависимая индукция ИР (с помощью конъюгатов БСА-пальмитиновой кислоты), индукция ИР с помощью факторов острого воспаления (бактериальный липополисахарид (ЛПС)), индукция ИР с помощью моделирования стресса ЭПР (брефелдин А), индукция ИР с помощью моделирования гипоксии (соли  $Co2+$ ). Все вышеуказанные воздействия моделируют патогенетические механизмы, сопровождающие развитие ожирение, латентного воспаления и ИР жировой ткани.

Липид-зависимую индукцию ИР выполняли согласно работе She и соавторов, с изменениями [210]. Зрелые 3T3-L1 депривировали в течение 24 часов в DMEM LG + 0.1% БСА, после чего ИР индуцировали путем инкубации зрелых адипоцитов в течение 24 часов в среде DMEM LG с добавлением 300 мкМ конъюгата пальмитиновой кислоты с БСА, приготовленного по протоколу Svedberg и соавторов [211], до конечной концентрации 300 мкМ и инкубировали в течение 24 часов, после чего выполняли тест на чувствительность клеток к инсулину.

Индукцию ИР с помощью факторов острого воспаления выполняли путем инкубации зрелых адипоцитов в течение 24 часов в среде DMEM HG + 10% FBS с добавлением ЛПС до конечной концентрации 50 нг/мл, после чего в течение 2 часов клетки депривировали от сыворотки в бессывороточном DMEM HG, после чего выполняли тест на чувствительность клеток к инсулину.

Индукцию ИР с помощью моделирования стресса ЭПР выполняли согласно работе Citterio и соавторов, с изменениями [212]. Зрелые адипоциты 3T3-L1 культивировали в течение 24 часов в DMEM HG + 10% FBS, содержащей брефелдин А в концентрации 100 мкМ. Затем в течение 2 часов клетки депривировали от сыворотки в бессывороточном DMEM HG, после чего выполняли тест на чувствительность клеток к инсулину.

Индукцию ИР с помощью моделирования гипоксии выполняли согласно работе Glassford и соавторов [213]. Моделирование гипоксии осуществляли путем стабилизации транскрипционного фактора HIF1 в присутствии ионов двухвалентного кобальта. Зрелые адипоциты 3T3-L1 культивировали в течение 12 часов в среде DMEM HG + 10% FBS с добавлением 200 мкМ CoCl<sub>2</sub>. Затем клетки депривировали 3 часа в бессывороточном DMEM HG, содержащем 200 мкМ CoCl<sub>2</sub> после чего выполняли тест на чувствительность клеток к инсулину.

Тест на чувствительность клеток к инсулину включал в себя оценку фосфорилирования основных участников инсулиновой сигнализации по их активирующим остаткам (pIRS1-Y612, pAkt-T308, pAkt-S473, pAS160-S318), а также оценку инсулин-индуцируемого захвата радиоактивных аналогов 3H-2-дезоксиглюкозы. Для оценки фосфорилирования основных участников инсулиновой сигнализации клетки стимулировали с помощью раствора инсулина (конечная концентрация 100 мкМ) в течение 20 минут, контрольные клетки стимуляции не подвергали, после чего по завершению эксперимента лизировали клетки в RIPA буфере (150 mM NaCl, 1% Triton-X100, 0.5% дезоксихолата натрия, 0.1% додецилсульфата натрия, 50 mM Tris-HCl с pH 8.0). В дальнейшем клеточные лизаты гомогенизировали инсулиновым шприцем с диаметром иглы 29G и использовали для иммуноблоттинга. Ниже приведен протокол оценки инсулин-индуцируемого захвата радиоактивных аналогов 3H-2-дезоксиглюкозы.

#### ***2.12. Коррекция воспалительного статуса и инсулиновой чувствительности адипоцитов с помощью рекомбинантного ИЛ-4***

Для оценки влияния коррекции воспалительного статуса адипоцитов на их инсулиновую чувствительность проводили обработку клеток в условиях липид-индуцируемой инсулиновой резистентности рекомбинантным ИЛ-4 (I1020, Sigma-Aldrich, США) в концентрациях 25 нг/мл, 50 нг/мл и 100 нг/мл. После обработки ИЛ-4 в условиях липид-индуцируемой ИР выполняли тест на чувствительность клеток к инсулину.

### ***2.13. Создание лентивирусной конструкции, кодирующей ИЛ-4***

Для создания лентивирусной конструкции, кодирующей ИЛ-4, проводили поиск последовательности для синтеза гена, кодирующего ИЛ-4 мыши. Последовательность гена выбирали по базе данных Nucleotide (NCBI Reference Sequence: NM\_021283.2). Согласно базе данных, ИЛ-4 имеет 1 вариант транскрипта мРНК, в качестве гена ИЛ-4 использовали кодирующую часть последовательности. Синтез необходимой последовательности заказали в компании «Евроген» (Россия) с последующей вставкой последовательности в коммерческую плазмиду LeGO-iG2 под промотор SFFV (spleen focus forming virus). Контроль синтеза осуществляли с помощью секвенирования полученной последовательности, что продемонстрировало полную идентичность синтезированной конструкции последовательности из базы данных Nucleotide. Было создано 2 варианта плазмиды - SFFV промотор + ген ИЛ-4 и SFFV промотор + ген ИЛ-4 + сайт множественной посадки рибосомы + eGFP. Вариант 2 создавали для контроля трансдукции клеток.

На следующем этапе получали рекомбинантные лентивирусы, несущие ген ИЛ-4 мыши. Упаковку вирусных частиц осуществляли в клетках линии НЕК293Т, которые трансфицировали кальций-фосфатным методом. При трансфекции клеток, культивируемых на чашке Петри диаметром 100 мм, соответствующие плазмиды смешивали с 1 мл раствора 0,3 М CaCl<sub>2</sub> и по каплям добавляли к 1 мл раствора 2xHBS (280 мМ NaCl, 1,5 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 50 мМ HEPES, pH 7,10). Инкубировали трансфекционную смесь в течение 2 минут и аккуратно наносили на клетки. Для получения рекомбинантных лентивирусов клетки, культивируемые на чашках Петри диаметром 100 мм, котрансфицировали плазмидами pMDLg/pRRE, pRSV-Rev, pMD2.G (все – Addgene, США) и одной из сконструированных плазмид: LeGO-Scramble (пустая плазида или плазида, не несущая смысловой последовательности), LeGO-IL4v1 или LeGO-IL4v2. На следующий день после трансфекции на клетки наносили свежую среду культивирования объемом 6 мл, в которую и

происходило выделение вируса. Через 24 часа среду с вирусными частицами отбирали, центрифугировали, удаляя тем самым плавающие клетки и клеточные фрагменты. Супернатант с вирусом разделяли на аликвоты и хранили при  $-70^{\circ}\text{C}$  до использования. Титр вируса определяли в компании «Евроген» (Россия), титр составил 4 вирусных частицы на клетку.

#### ***2.14.Лентивирусная трансдукция зрелых адипоцитов и контроль наработки трансгена***

Полученные рекомбинантные лентивирусы, несущие ген ИЛ-4 мыши, были использованы нами для получения модифицированных адипоцитов 3T3-L1. При трансдукции лентивирусом оптимальным был протокол, по которому к клеткам, содержащимся в 1 мл среды культивирования в лунке 6-луночного культурального планшета, добавляли 1 мл вирусного препарата и трансдуцирующий агент Polybrene (8 мкг/мл). Далее клетки инкубировали без смены среды не менее 24 ч., после чего проводили флуоресцентную микроскопию на микроскопе Zeiss Axio Observer A1 (Zeiss, Германия) для контроля трансдукции. При подборе оптимальной концентрации вирусного стока применяли оценку цитотоксичности с использованием метиленового синего.

Следующим этапом нашей работы была оценка наработки мРНК трансгена ИЛ-4, а также нативного белка ИЛ-4. Зрелые адипоциты 3T3-L1 трансдуцировали лентивирусными конструкциями в соотношении вирусный сток : среда культивирования = 1 : 1 в течение 24 часов, после чего заменяли кондиционированную среду на свежую среду культивирования и инкубировали трансдуцированные клетки в среде в течение 3 и 5 дней соответственно. Затем отбирали кондиционированные среды, центрифугировали их при 200g для удаления клеточного дебриса и использовали для оценки концентрации нативного ИЛ-4 в кондиционированной среде методом ИФА (набор ИФА Mouse IL-4 Quantikine ELISA, №M4000B). После отбора кондиционированных сред клетки лизировали в RLT буфере набора реактивов для выделения

тотальной РНК RNEasy Qiagen согласно пункту 2.7, далее тотальную РНК выделяли по инструкции производителя. Далее синтез кДНК и ПЦР в реальном времени осуществляли согласно протоколам, описанным в пункте 2.8. Последовательности праймеров для гена ИЛ-4: прямой праймер 5'-СТСГААТГТАССАГГАССА-3', обратный праймер 5'-ТСТГТГГТГТТСТТСТГТТГСТ-3'. Экспрессию и секрецию ИЛ-4 определяли на 4 и 6 дни после совершения трансдукции.

### ***2.15. Оценка инсулин-индуцируемого захвата радиоактивных аналогов [<sup>3</sup>H]-2-дезоксиглюкозы***

Для оценки инсулин-индуцируемого захвата радиоактивных аналогов 3H-2-дезоксиглюкозы зрелые адипоциты 3T3-L1 депривировали в течение 4 часов в DMEM LG + 0.1% БСА, после чего клетки промывали DMEM без добавления глюкозы 3 раза. Затем клетки инкубировали в присутствии 100 нМ инсулина в течение 20 минут. Для контроля неспецифического захвата глюкозы через инсулин-независимые транспортеры в серию контрольных образцов добавляли цитохалазин В в концентрации 20 мкМ на 20 минут. Затем заменяли среды с инсулином и цитохалазином В на среду, содержащую растворы дезоксиглюкозы (100 мкМ 2-дезоксиглюкозы + 0.5 мкКи [<sup>3</sup>H]-2-дезоксиглюкозы), время инкубации составило 10 минут. В работе использовали [<sup>3</sup>H]-2-дезоксиглюкозу фирмы PerkinElmer, США; формула 2-[1,2-<sup>3</sup>H(N)]-дезоксиглюкоза; каталожный номер NET328A001MC. Затем клетки осторожно промывали дважды ледяным PBS и замораживали на -20°C для нарушения целостности клеточной мембраны. Для измерения входа радиоактивных аналогов 2-дезоксиглюкозы клетки размораживали, лизировали в 300 мкл RIPA буфера, после чего 100 мкл отбирали для измерения концентрации белка в пробе с использованием бицинхониновой кислоты (Pierce BCA Protein Assay Kit, #23225, ThermoScientific, США). 200 мкл лизата растворяли в сцинтилляционной жидкости Beckman Ready-Solv HP (#158726, Beckman, США) и измеряли количество распадов на миллиграмм белка в образце. Из

полученных результатов вычитали показатели счета в образцах с цитохалазином В, отсекая инсулин-независимый вход глюкозы.

### ***2.16. Иммуноблоттинг***

Для проведения иммуноблоттинга клеточные лизаты разделяли с помощью электрофореза в денатурирующих условиях по методу Лэммли [214]. Электроперенос белков выполняли на поливинилиденфторидные мембраны в режиме 1 Ампер/час. Мембраны блокировали не менее 2 часов в 5% растворе обезжиренного молока (Applichem, Германия) в TBST и последовательно обрабатывали первичными и вторичными антителами, растворенными в 1% растворе обезжиренного молока на TBST, в разведениях, согласно инструкциям производителя. Белковые полосы визуализировали с использованием хемилюминесцентного набора реактивов Clarity ECL (Bio-Rad, США) и геледокументирующей системы FusionX (Vilber Lourmat, Франция). Для иммуноблоттингов в работе использовали следующие антитела: pIRS1-Y612 (#44816, ThermoScientific, США), tIRS1 (#3407, Cell Signaling, США), pAkt-T308 (#9275, Cell Signaling, США), pAkt-S473 (#4060, Cell Signaling, США), tAkt (#ab64148, Abcam, США), pAS160-S318 (#8619, Cell Signaling, США), tAS160 (#2670, Cell Signaling, США), pJNK1/2-T183/Y185 (#AF1205, R&D, США), tJNK1/2 (#AF1387, R&D, США), pSTAT6-Y641 (#28829, Abcam, США), tSTAT6 (#ab32520, Abcam, США), винкулин (#ab18058, Abcam, США). В качестве вторичных антител использовали антитела козы к IgG кролика (#ab6721, Abcam, США) и антитела козы к IgG мыши (#ab97023, Abcam, США), конъюгированные с пероксидазой Horseradish sp. Для количественной денситометрии использовали программу GelAnalyzer2010a.

### ***2.17. Иммуноцитохимическое исследование ядерной транслокации транскрипционного фактора STAT6***

Для понимания механизмов действия ИЛ-4 на инсулиновую чувствительность зрелых адипоцитов было проведено исследование динамики

распределения транскрипционного фактора STAT6 в ответ на действие рекомбинантного ИЛ-4. Для проведения исследования преадипоциты 3T3-L1 высевали в лунки культурального планшета, на дне которых лежали стерильные покровные стекла. После прикрепления клеток к дну планшета и покровному стеклу проводили адипоцитарную дифференцировку преадипоцитов согласно пункту 2.10. После завершения адипоцитарной дифференцировки клетки депривировали в течение 18 часов в бессывороточной DMEM HG, после чего выполняли стимуляцию клеток рекомбинантным ИЛ-4 в концентрации 50 нг/мл в присутствии/отсутствии конъюгата БСА-пальмитиновая кислота в течение 20 минут, 1 часа и 24 часов. После стимуляции клетки на стеклах фиксировали в 4% растворе формальдегида в течение 15 минут, затем промывали стекла три раза PBS. Для пермеабилзации клеток и проникновения антител к ядерным антигенам проводили обработку клеток 0.2% р-ром Triton X100 на PBS, а также кипящим раствором Antigen Unmasking Solution (Vector, США). Стекла отмывали 3 раза в PBS, после чего проводили блокировку 10% р-ром сыворотки донора вторичных антител в течение 1 часа при комнатной температуре. После блокировки проводили отмывку клеток в PBS 1 раз в течение 5 минут и инкубировали клетки с первичными антителами (tSTAT6 (#ab32520, Abcam, США)) в течение 18 часов при температуре +4°C. Затем стекла отмывали 3 раза в PBS и инкубировали клетки с вторичными антителами (антитела козы против иммуноглобулинов мыши, конъюгированные с красителем AlexaFluor594, #A21203, Molecular Probes, США) при комнатной температуре в течение 1 часа. После этого срезы трижды промывали ФСБ, в процессе чего проводили окрашивание ядерным красителем DAPI (Sigma-Aldrich, США). После полной промывки срезы промывали в дистиллированной воде и заключали в AquaPolyMount (PolySciences, США). Препараты высушивали в темноте в течение двух дней, после чего проводили конфокальную микроскопию на микроскопе Zeiss LSM780 (Zeiss, Германия).

## ***2.18. Анализ изменения протеома зрелых адипоцитов 3T3-L1 при кратком и длительном действии ИЛ-4***

Изучение влияния ИЛ-4 на протеом зрелых адипоцитов 3T3-L1 проводили с использованием "Shotgun" масс-спектрометрического анализа. К дифференцированным адипоцитам 3T3-L1, преинкубированным с ИЛ-4 в течение 1 часа и 24 часов, добавляли денатурирующий раствор, состоящий из 5 М мочевины, 15% ацетонитрила, 0.5% дезоксихолиевой кислоты натриевой соли, 300 мМ натрий-фосфатного буфера pH 6.0 и 5 мМ трихлорэтилфосфата. Смесь обрабатывали в ультразвуковой ванне (45°C, 30 мин), затем добавляли раствор 2% 4-винилпиридина в 30% пропан-2-оле до конечной концентрации 0.2%. Реакцию алкилирования инкубировали при 22°C в течение 30 мин. Затем проводили трипсинолиз: 2 ч, 38°C при соотношении трипсина к субстрату 1:50 (по массе), и 2 ч, 38°C при соотношении 1:100, (по массе). Реакцию останавливали добавлением муравьиной кислоты. После предварительного обогащения на колонке C-18 m-PrecolumnPermap ("Thermo Scientific") проводили хроматографическое разделение пептидов на аналитической колонке C-18 AcclaimPermap ("Thermo Scientific") в градиенте ацетонитрила. Масс-спектрометрический анализ проводили на гибридном орбитальном масс-спектрометре высокого разрешения с линейной ионной ловушкой, "OrbitrapFusion" с системой ВЭЖХ "UltiMate 3000 Binare RSLCnano", ("Thermo Fisher Scientific"). Применяли трехсегментный дифференцированный метод сканирования с переменным использованием различных типов активации (HCD и CID), изоляции и типа детектора. Для масс-спектрометрического анализа использовали оборудование ЦКП "Протеом человека", поддержанного Министерством образования и науки РФ в рамках выполнения соглашения № 14.621.21.0017 (RFMEFI62117X0017).

Идентификацию белков проводили с помощью программного обеспечения "Search Gui 3.3" ("Compromics") по поисковому алгоритму X!Tandem Vengeance 12.15.2. Количественный анализ проводился на основании показателя NSAF

(нормированный показатель спектральной интенсивности) в выборке общих для группы проб белков после выравнивания по интенсивности опорных спектров. Сопоставление данных об изменении общих идентифицированных белков проводили в линейных координатах, принимая значимым, если хотя бы более чем в 2 повторах обработки клеток ИЛ-4 экспрессия данного белка изменилась более чем в 2 раза; условно значимым принимали также случаи, если во всех повторах обработки клеток ИЛ-4 экспрессия данного белка изменилась (больше или меньше 1). Сопоставление проводили с использованием программного пакета MS Excel 2010. Свойства и функции значимых отличающихся белков (в 2 и более раза) анализировали с помощью базы данных UniProt, а также данных литературы. Для общего массива условно значимых отличающихся белков проводили анализ обнаруженных белков в терминах онтологии генов с помощью баз данных PANTHER version 11. Иерархический кластерный анализ с построением «тепловой карты» изменений в структуре общего белкового состава адипоцитов проводили с использованием инструмента HEATMAPPER.

### ***2.19. Статистический анализ***

Для статистического анализа полученных результатов использовали пакеты программ Microsoft Excel и Statistica8.0. Данные, полученные на клеточных линиях, представлены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение. Для расчета достоверности различий использовали двухвыборочный Т-критерий с различной дисперсией выборок, принимая достоверными различия с вероятностью  $p < 0.05$ .

Клинические параметры пациентов представлены как медиана [минимальное значение, максимальное значение]. Для расчета достоверности различий использовали двухвыборочный критерий Манна-Уитни, принимая достоверными различия с вероятностью  $p < 0.05$ .

Данные, полученные на материале пациентов, представлены как среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Для расчета достоверности различий

использовали двухвыборочный критерий Манна-Уитни, принимая достоверными различия с вероятностью  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### *3.1. Клиническая характеристика пациентов, включенных в исследование*

Общая клиническая характеристика пациентов, включенных в исследование, представлена в Таблице 3. Медиана уровня глюкозы крови натощак составила 8.56 [6.87; 11.57] мМ и медиана уровня гликированного гемоглобина крови составила 7.40 [6.65; 8.10] % для пациентов с диагностированным СД2Т; медиана уровня глюкозы крови натощак составила 4.98 [4.77; 5.83] мМ и медиана уровня гликированного гемоглобина крови составила 5.40 [5.20; 5.80] % для пациентов с нормальной толерантностью к глюкозе,  $p < 0.05$ . ИМТ значимо не различался между исследуемыми группами пациентов и составил 42.26 [34.83; 46.75] кг/м<sup>2</sup> для пациентов с диагностированным СД2Т против 44.25 [36.27; 53.46] кг/м<sup>2</sup> для пациентов с нормальной толерантностью к глюкозе.

Таблица 3. Клиническая характеристика пациентов, включенных в исследование

Характеристика	Пациенты с нормальной толерантностью к глюкозе	Пациенты с диагностированным СД2Т
Пол	4 женщины + 1 мужчина	4 женщины + 1 мужчина
Возраст, лет	33 [29; 44]	42 [35; 59]
ИМТ, кг/м <sup>2</sup>	44.25 [36.27; 53.46]	42.26 [34.83; 46.75]
Уровень глюкозы крови натощак, мМ	4.98 [4.77; 5.83]	8.56 [6.87; 11.57]
Уровень гликированного гемоглобина, %	5.40 [5.20; 5.80]	7.40 [6.65; 8.10]
НОМА-IR индекс	4.21 [1.64; 8.23]	13.23 [8.36; 20.33]

М-индекс, мг/кг/мин	4.14 [3.44; 5.75]	1.23 [0.61; 1.57]
---------------------	-------------------	-------------------

Степень тяжести ИР измеряли с помощью гиперинсулинемического эугликемического клэмп теста для всех пациентов, включенных в исследование. Значение М-индекса составило 1.23 [0.61; 1.57] мг/кг/мин для пациентов с диагностированным СД2Т против 4.14 [3.44; 5.75] мг/кг/мин для пациентов с нормальной толерантностью к глюкозе. Это свидетельствует о наличии тяжелой степени ИР у пациентов с диагностированным СД2Т и мягкой/средней степени ИР у пациентов с нормальной толерантностью к глюкозе.

### ***3.2. Подкожная и сальниковая жировые ткани пациентов с ожирением и СД2Т имеют в своем составе гипертрофированные адипоциты***

Биопсии подкожной и сальниковой жировой тканей были получены от пациентов с ожирением и наличием/отсутствием СД2Т. Средняя площадь адипоцита в составе подкожной жировой ткани пациентов с СД2Т была в 1.5 раза больше, чем в составе подкожной жировой ткани пациентов с нормальной глюкозной толерантностью (Рис.1 А-Б) ( $2812 \text{ мкм}^2 \pm 209 \text{ мкм}^2$  для пациентов с СД2Т и  $2003 \text{ мкм}^2 \pm 128 \text{ мкм}^2$  для пациентов с нормальной глюкозной толерантностью, \*  $p < 0.01$ , критерий Манна-Уитни). Средняя площадь адипоцита в составе сальниковой жировой ткани пациентов с СД2Т была в 1.2 раза больше, чем в составе сальниковой жировой ткани пациентов с нормальной глюкозной толерантностью (Рис.1. В-Г) ( $2224 \text{ мкм}^2 \pm 142 \text{ мкм}^2$  для пациентов с СД2Т и  $1897 \text{ мкм}^2 \pm 100 \text{ мкм}^2$ , \*\*  $0.01 < p < 0.05$ , критерий Манна-Уитни). Таким образом, адипоциты как в составе подкожной, так и в составе сальниковой жировых тканей гипертрофированы относительно адипоцитов в составе жировой ткани пациентов с нормальной глюкозной толерантностью.

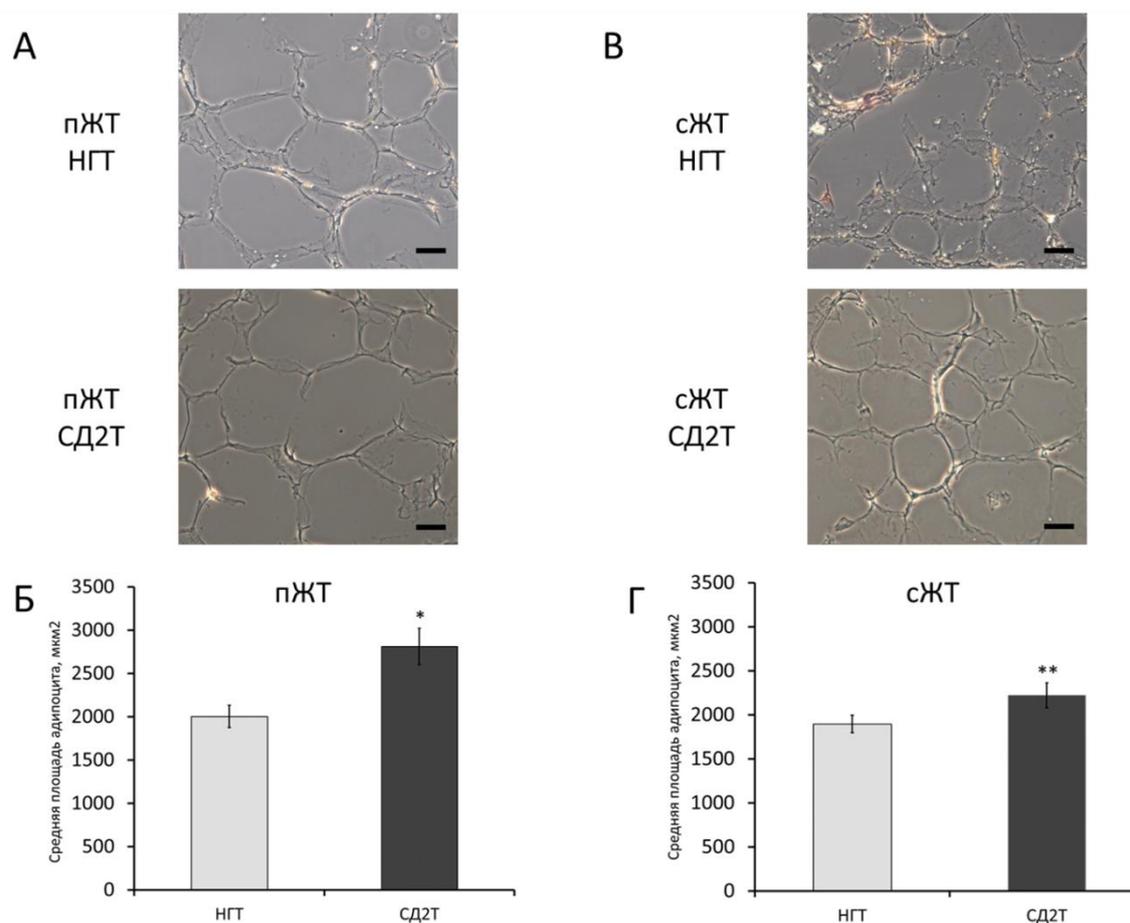


Рис.1. Средняя площадь адипоцита подкожной и сальниковой жировых тканей пациентов с НГТ и СД2Т. А – репрезентативная фотография адипоцитов подкожной жировой ткани, Б – гистограмма средней площади адипоцита подкожной жировой ткани, В – репрезентативная фотография адипоцитов сальниковой жировой ткани, Г – гистограмма средней площади адипоцита сальниковой жировой ткани. пЖТ – подкожная жировая ткань, сЖТ – сальниковая жировая ткань, НГТ – нормальная толерантность к глюкозе, СД2Т – сахарный диабет 2 типа. Данные на гистограммах представлены как среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего, критерий Манна-Уитни. \*  $p < 0.01$ , \*\*  $0.01 < p < 0.05$ . Масштабный отрезок 20 мкм.

***3.3. Подкожная и сальниковая жировые ткани пациентов с ожирением и СД2Т имеют высокую степень инфильтрации CD68-позитивными клетками***

Гипертрофия адипоцитов может вести к активации воспалительного процесса в составе жировой ткани, поэтому мы оценивали степень инфильтрации подкожной и сальниковой жировых тканей CD68-позитивными клетками. Пациенты с СД2Т имеют в 2 раза большую инфильтрацию подкожной жировой ткани CD68-позитивными клетками по сравнению с пациентами с НГТ (Рис.2. А-Б) ( $21.6\% \pm 2.5\%$  CD68-позитивных клеток в поле зрения у пациентов с СД2Т против  $10.3\% \pm 1.2\%$  CD68-позитивных клеток в поле зрения у пациентов с НГТ, \*  $p < 0.01$ , критерий Манна-Уитни). Также пациенты с СД2Т имеют в 2.6 раза более высокую инфильтрацию CD68-позитивными клетками сальниковой жировой ткани по сравнению с пациентами с НГТ (Рис.2. В-Г) ( $18.4\% \pm 1.8\%$  CD68-позитивных клеток в поле зрения у пациентов с СД2Т против  $7.1\% \pm 1.5\%$  CD68-позитивных клеток в поле зрения у пациентов с НГТ, \*  $p < 0.01$ , критерий Манна-Уитни).

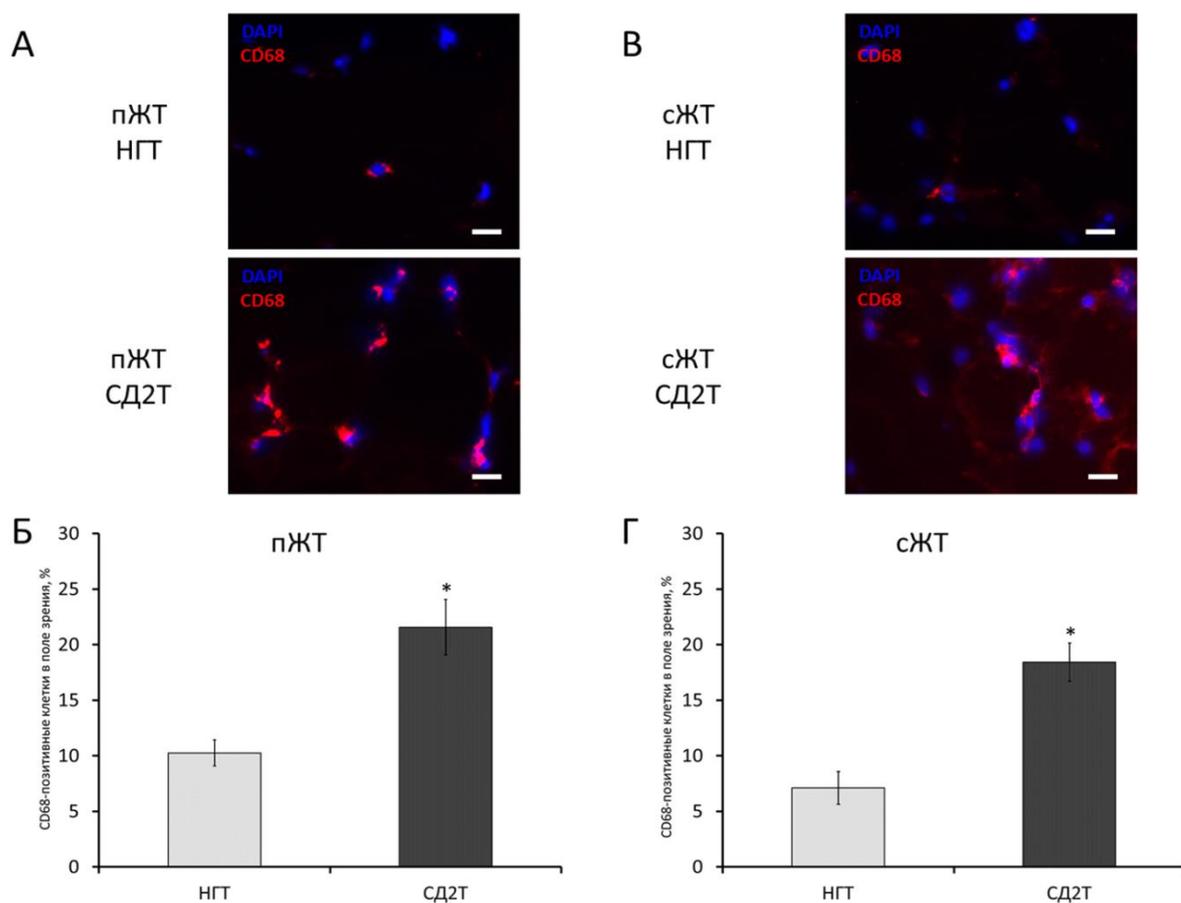


Рис.2. Инфильтрация CD68-позитивными клетками подкожной и сальниковой жировых тканей пациентов с СД2Т и НГТ. А – репрезентативная

фотография инфильтрации CD68-позитивными клетками подкожной жировой ткани, Б – гистограмма степени инфильтрации подкожной жировой ткани CD68-позитивными клетками, В – репрезентативная фотография инфильтрации CD68-позитивными клетками сальниковой жировой ткани, Г – гистограмма степени инфильтрации сальниковой жировой ткани CD68-позитивными клетками. пЖТ – подкожная жировая ткань, сЖТ – сальниковая жировая ткань, НГТ – нормальная толерантность к глюкозе, СД2Т – сахарный диабет 2 типа. Данные на гистограммах представлены как среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего, критерий Манна-Уитни. \*  $p < 0.01$ , \*\*  $0.01 < p < 0.05$ . Масштабный отрезок 40 мкм.

#### ***3.4. Подкожная и сальниковая жировые ткани пациентов с ожирением и СД2Т не имеют статистически значимых различий по числу макрофагов, экспрессирующих CCR7***

Для дальнейшего понимания фенотипа макрофагов, инфильтрирующих жировую ткань больных, мы оценили количество M1-подобных макрофагов, экспрессирующих одновременно поверхностные маркеры CD68 и CCR7. CCR7 является классическим маркером провоспалительных M1-макрофагов [215, 216]. В подкожной и сальниковой жировых тканях как у пациентов с СД2Т, так и у пациентов с НГТ, мы обнаружили, что около 60% общей популяции макрофагов жировой ткани имеют M1-подобный фенотип (Рис.3.). Мы не выявили статистически значимых различий между инфильтрацией M1-подобными макрофагами независимо от типа жировой ткани для больных с СД2Т и НГТ.

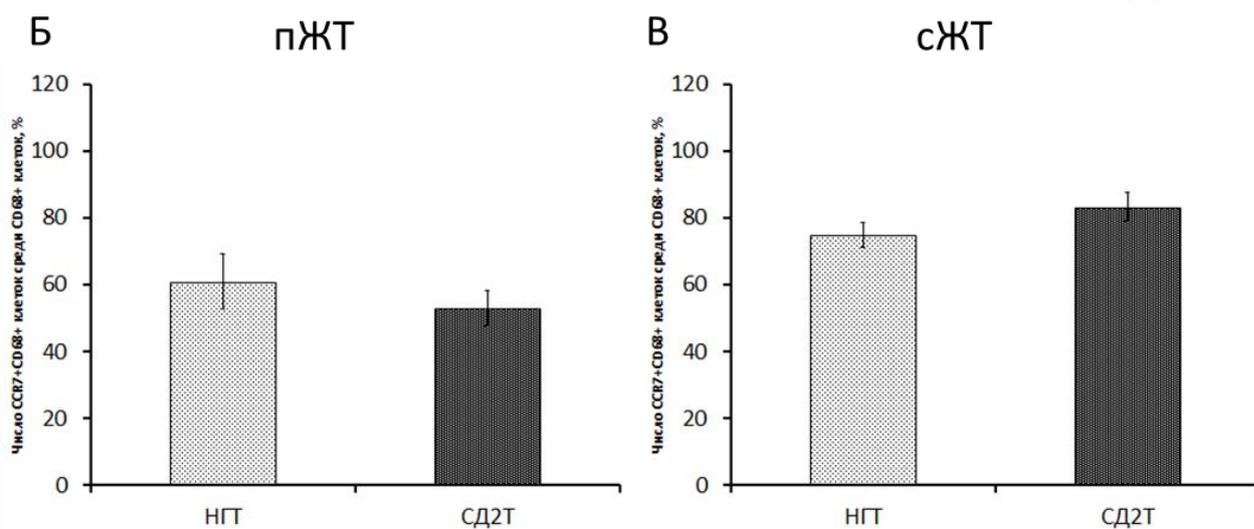
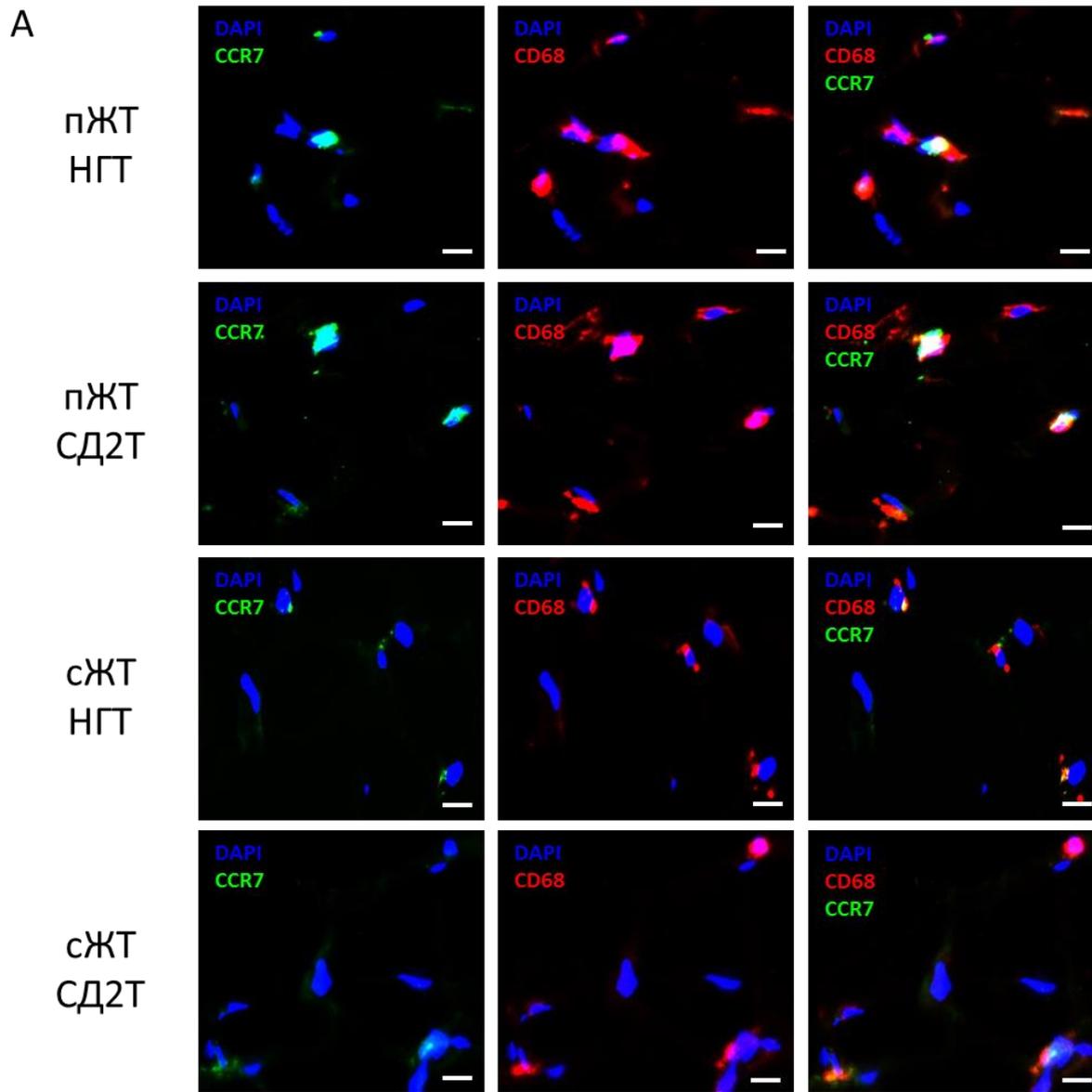


Рис.3. Определение M1-подобных макрофагов на срезах подкожной и сальниковой жировых тканей. А - панель репрезентативных фотографий срезов,

окрашенных антителами против CD68 и CCR7, Б - число CD68+CCR7+ клеток среди CD68+-клеток на срезах подкожной жировой ткани, В - число CD68+CCR7+ клеток среди CD68+-клеток на срезах сальниковой жировой ткани. пЖТ – подкожная жировая ткань, сЖТ – сальниковая жировая ткань, НГТ – нормальная толерантность к глюкозе, СД2Т – сахарный диабет 2 типа. Данные на гистограммах представлены как среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего, критерий Манна-Уитни. \*  $p < 0.01$ , \*\*  $0.01 < p < 0.05$ . Масштабный отрезок 40 мкм.

### ***3.5. Подкожная и сальниковая жировые ткани пациентов с ожирением и СД2Т имеют сниженное количество макрофагов, экспрессирующих CD206***

Также мы оценили количество М2-подобных макрофагов, экспрессирующих одновременно поверхностные маркеры CD68 и CD206. CD206 является классическим маркером противоспалительных М2-макрофагов [215, 216]. В подкожной и сальниковой жировых тканях пациентов с НГТ почти все макрофаги имеют М2-подобный фенотип (CD68+CD206+ клетки). Однако, жировая ткань пациентов с СД2Т имеет статистически значимые различия по количеству М2-подобных макрофагов от пациентов с НГТ. Продемонстрировано, что около 85% общего числа макрофагов подкожной жировой ткани и около 70% общего числа макрофагов сальниковой жировой ткани у пациентов с СД2Т имеют М2-подобный фенотип (Рис.4.). Согласно полученным результатам мы можем сказать, что макрофаги жировой ткани пациентов без СД2Т несут на своей поверхности М2-маркеры, в то время как в популяции макрофагов жировой ткани пациентов с СД2Т содержат в своем составе субпопуляцию М1-подобных макрофагов.

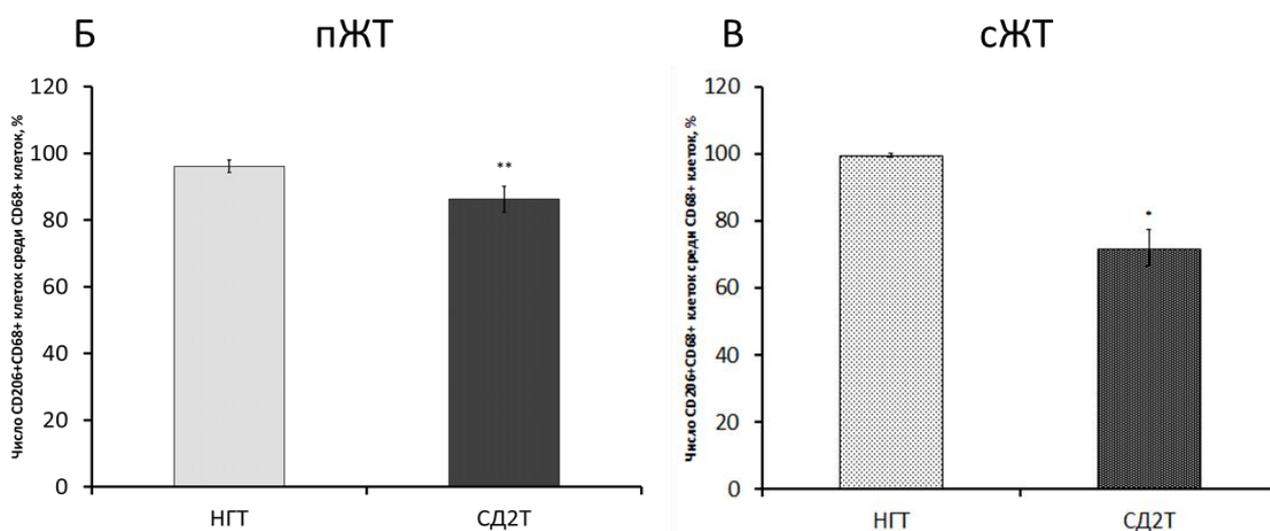
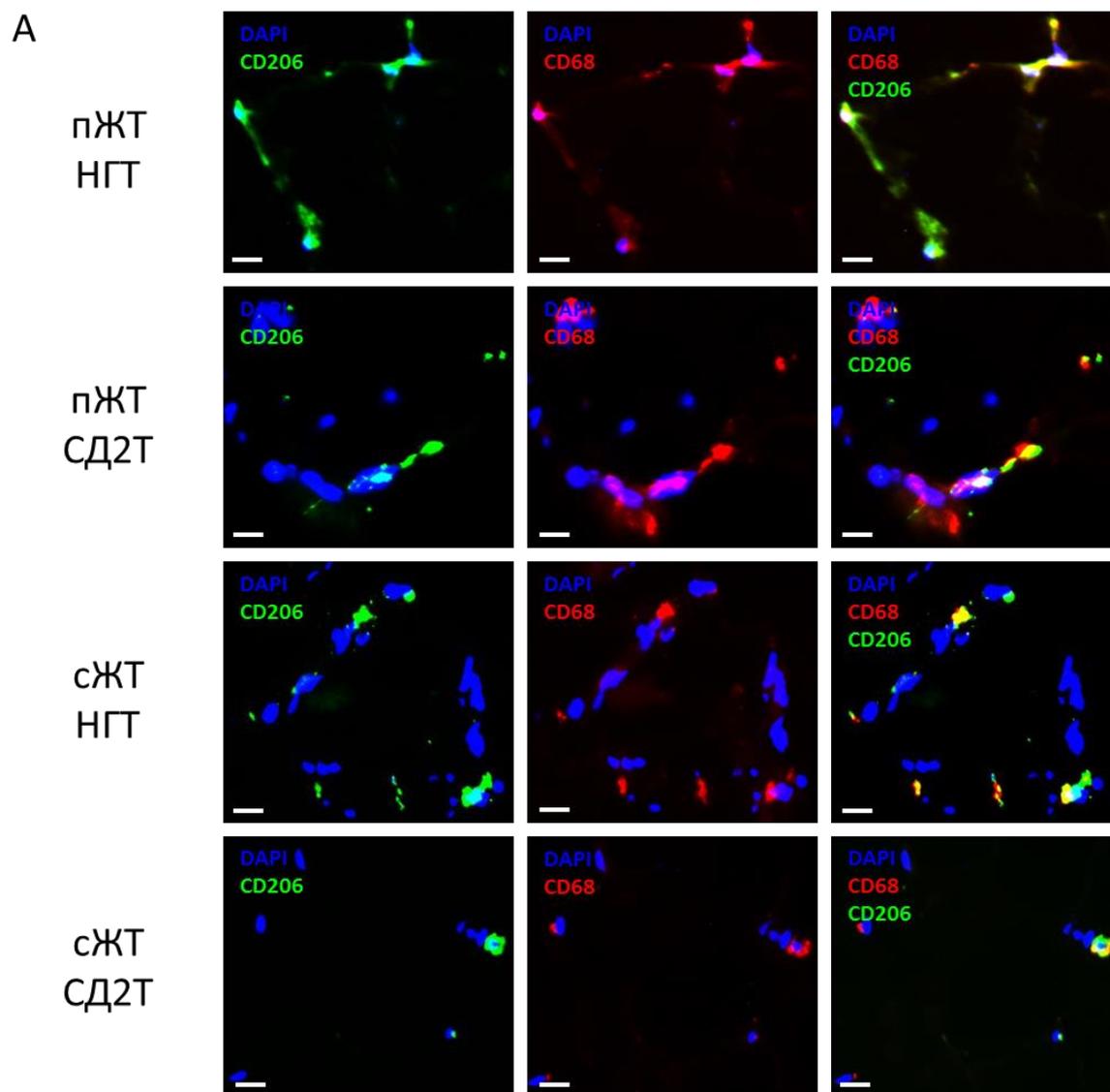


Рис.4. Определение M2-подобных макрофагов на срезах подкожной и сальниковой жировых тканей. А - панель репрезентативных фотографий срезов, окрашенных антителами против CD68 и CD206, Б - число CD68+CD206+

клеток среди CD68+-клеток на срезах подкожной жировой ткани, В - число CD68+CD206+ клеток среди CD68+-клеток на срезах сальниковой жировой ткани. пЖТ – подкожная жировая ткань, сЖТ – сальниковая жировая ткань, НГТ – нормальная толерантность к глюкозе, СД2Т – сахарный диабет 2 типа. Данные на гистограммах представлены как среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего, критерий Манна-Уитни. \*  $p < 0.01$ , \*\*  $0.01 < p < 0.05$ . Масштабный отрезок 40 мкм.

### ***3.6. МСК подкожной жировой ткани пациентов с СД2Т имеют ухудшенную динамику пролиферативной активности по сравнению с МСК подкожной жировой ткани пациентов с НГТ с 24 до 96 часов наблюдения***

Для анализа FBS-индуцированной пролиферативной активности МСК подкожной жировой ткани мы использовали МТТ-тест и анализ распределения по фазам клеточного цикла с использованием йодистого пропидия. В работе мы продемонстрировали, что МСК подкожной жировой ткани пациентов с СД2Т имеют ухудшенную кинетику пролиферации и число клеток было в 2, 2, 3 и 5 раз ниже на 24, 48, 72 и 96 часах наблюдения по сравнению с МСК подкожной жировой ткани пациентов с НГТ (Рис.5А). Более того, согласно данным анализа распределения по фазам клеточного цикла, обработка FBS МСК подкожной жировой ткани пациентов с СД2Т в течение 24 часов не повысила число клеток в G2/S фазе клеточного цикла (Рис.5В), что согласуется с данными МТТ-теста. В качестве контроля мы использовали МСК подкожной жировой ткани пациентов с НГТ, обработка их FBS продемонстрировала повышение числа клеток в G2/S фазе в 1.5 раза за 24 часа, что согласуется с данными МТТ-теста.

### ***3.7. МСК сальниковой жировой ткани пациентов с СД2Т имеют ухудшенную динамику пролиферативной активности по сравнению с МСК сальниковой жировой ткани пациентов с НГТ на 72 и 96 часах наблюдения***

Для анализа FBS-индуцированной пролиферативной активности МСК подкожной жировой ткани мы использовали МТТ-тест и анализ распределения по фазам клеточного цикла с использованием йодистого пропидия. В работе мы

продemonстрировали, что МСК салъниковой жировой ткани пациентов с СД2Т имеют ухудшенную кинетику пролиферации и число клеток было в 1.5 и 2 раза ниже на 72 и 96 часах наблюдения по сравнению с МСК салъниковой жировой ткани пациентов с НГТ (Рис.5Б). Согласно данным анализа распределения по фазам клеточного цикла, обработка FBS МСК салъниковой жировой ткани пациентов с СД2Т в течение 24 часов повысила число клеток в G2/S фазе клеточного цикла в 1.5 раза (Рис.5Г), что согласуется с данными МТТ-теста. В качестве контроля мы использовали МСК салъниковой жировой ткани пациентов с НГТ, обработка их FBS продемонстрировала повышение числа клеток в G2/S фазе в 1.5 раза за 24 часа, что согласуется с данными МТТ-теста. Тем не менее, статистически достоверных различий между активацией пролиферации за 24 часа МСК салъниковой жировой ткани пациентов с СД2Т и пациентов с НГТ не выявлено.

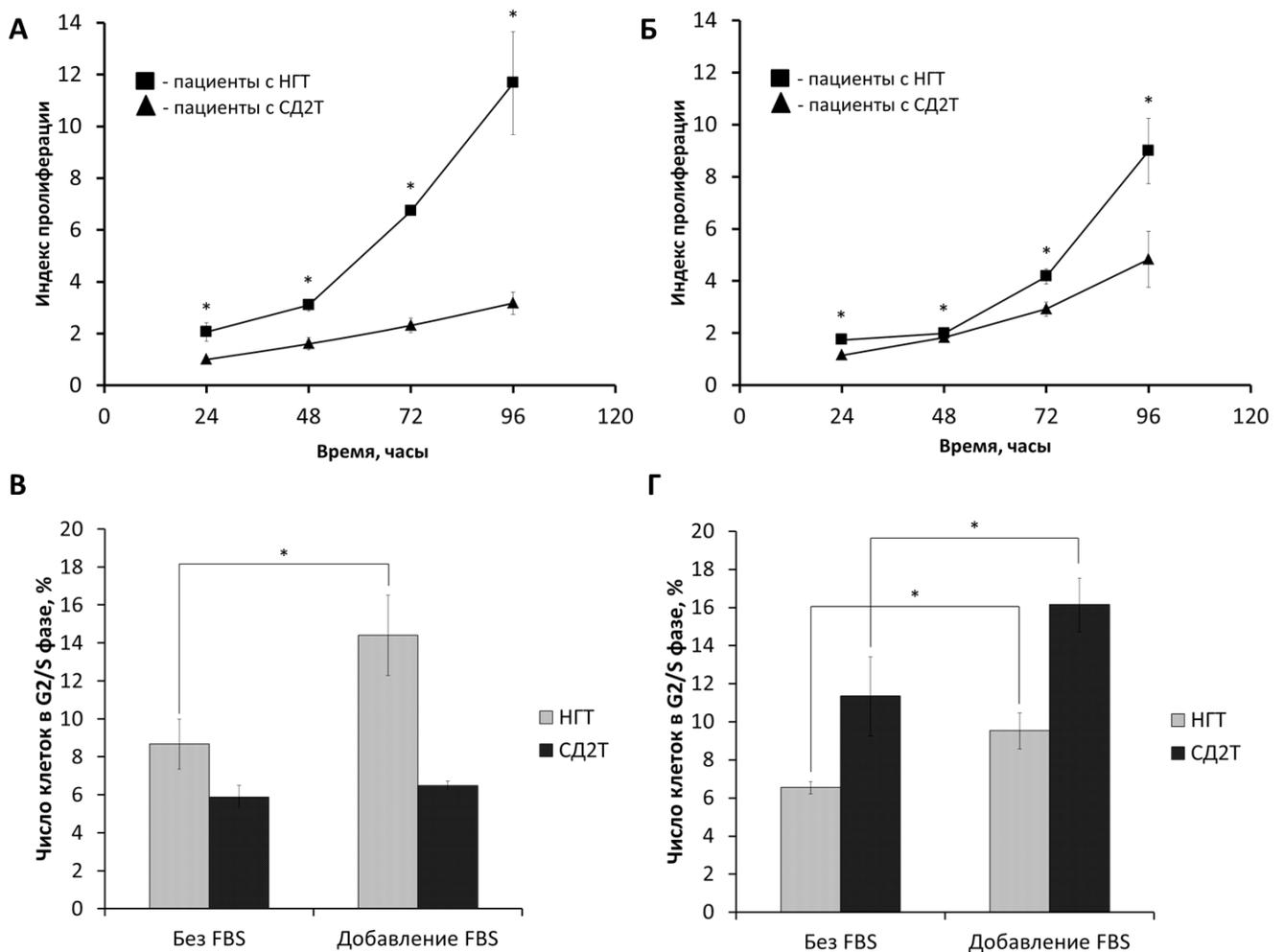


Рис.5. Пролиферативный потенциал МСК ЖТ пациентов с НГТ и СД2Т. А - зависимость пролиферативного индекса от времени для МСК подкожной жировой ткани, Б - зависимость пролиферативного индекса от времени для МСК сальниковой жировой ткани, В - число клеток в G2/S фазе до и после обработки МСК подкожной жировой ткани FBS, Г - число клеток в G2/S фазе до и после обработки МСК сальниковой жировой ткани FBS. НГТ – нормальная толерантность к глюкозе, СД2Т – сахарный диабет 2 типа.

### ***3.8. Активность стресс-активируемой киназы JNK повышена в адипоцитах, полученных из МСК ЖТ пациентов с СД2Т***

Для оценки степени воспаления в составе МСК ЖТ пациентов с СД2Т и НГТ мы провели анализ фосфорилирования активирующих аминокислотных остатков стресс-активируемой воспалительной киназы JNK, которая участвует в формировании воспаления жировой ткани и ИР при ожирении [31], в составе адипоцитов, полученных из МСК ЖТ пациентов. Результаты иммуноблоттинга представлены на Рис.6. Они демонстрируют рост активирующего фосфорилирования JNK в 3 раза в адипоцитах, полученных из МСК ЖТ пациентов с СД2Т, по сравнению с адипоцитами, полученными из МСК ЖТ пациентов с НГТ. Таким образом, адипоциты, полученные из МСК ЖТ пациентов с СД2Т, в культуре сохраняют повышенный воспалительный фон, что позволяет предположить, что воспаление регулирует их функциональное состояние.

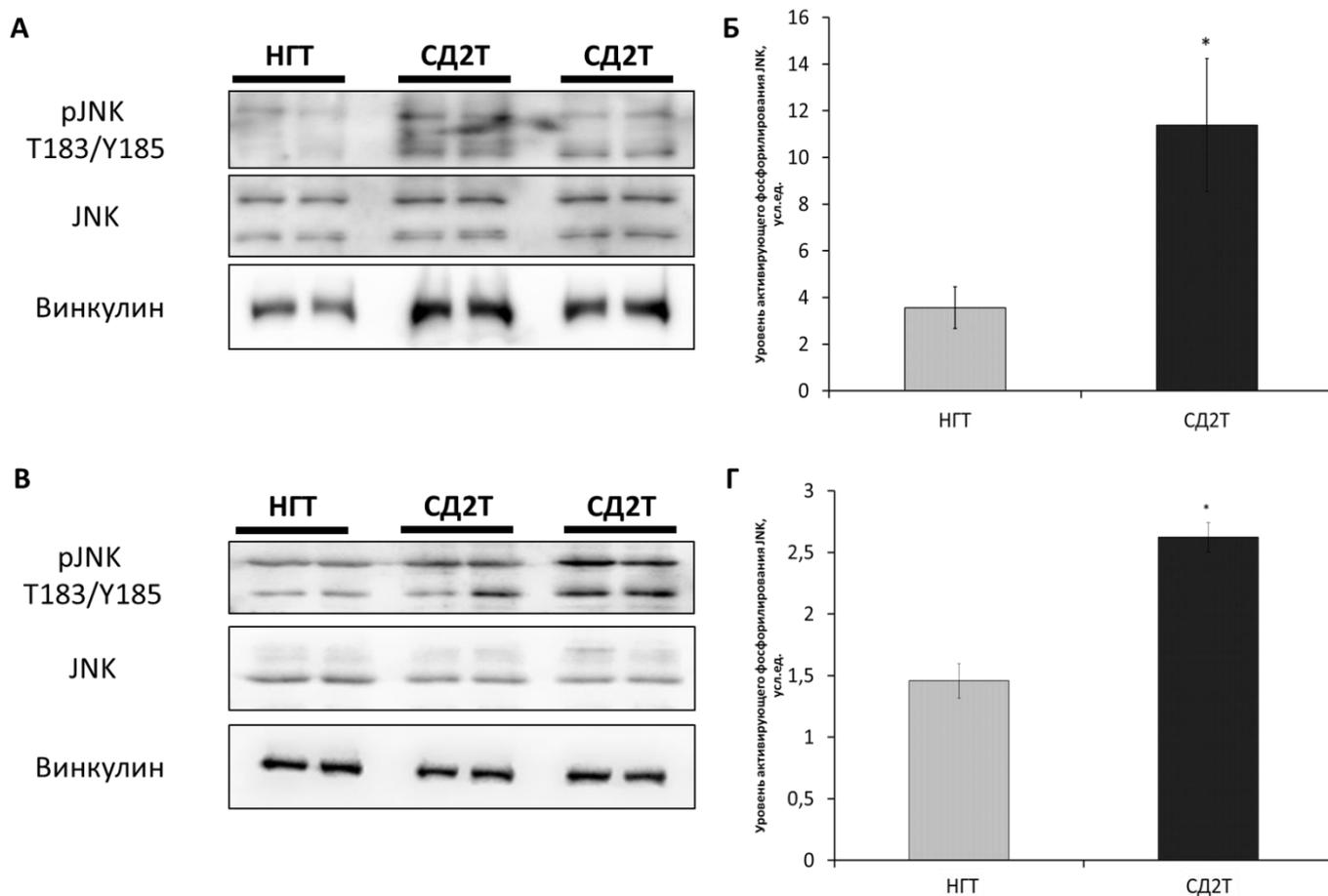


Рис.6. Повышенное фосфорилирование JNK в зрелых адипоцитах, полученных из МСК жировой ткани пациентов с СД2Т. А - репрезентативные иммуноблоттинги для МСК подкожной жировой ткани, Б - результаты денситометрии для МСК подкожной жировой ткани, В - репрезентативные иммуноблоттинги для МСК сальниковой жировой ткани, Г - результаты денситометрии для МСК сальниковой жировой ткани. НГТ – нормальная толерантность к глюкозе, СД2Т – сахарный диабет 2 типа. Данные представлены как среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего, различия определены по критерию Манна-Уитни, \*  $p < 0.01$ .

### ***3.9. МСК ЖТ пациентов с СД2Т имеют пониженную способность к адипогенной дифференцировке, по сравнению с МСК ЖТ пациентов с НГТ***

Помимо оценки пролиферативной активности выделенных МСК ЖТ, нами была проведена оценка способности выделенных МСК ЖТ к адипоцитарной дифференцировке с использованием качественной (окраска липофильным

красителем OilRedO) и количественной (измерение экспрессии мРНК генов-маркеров адипогенеза методом ПЦР в реальном времени) оценок.

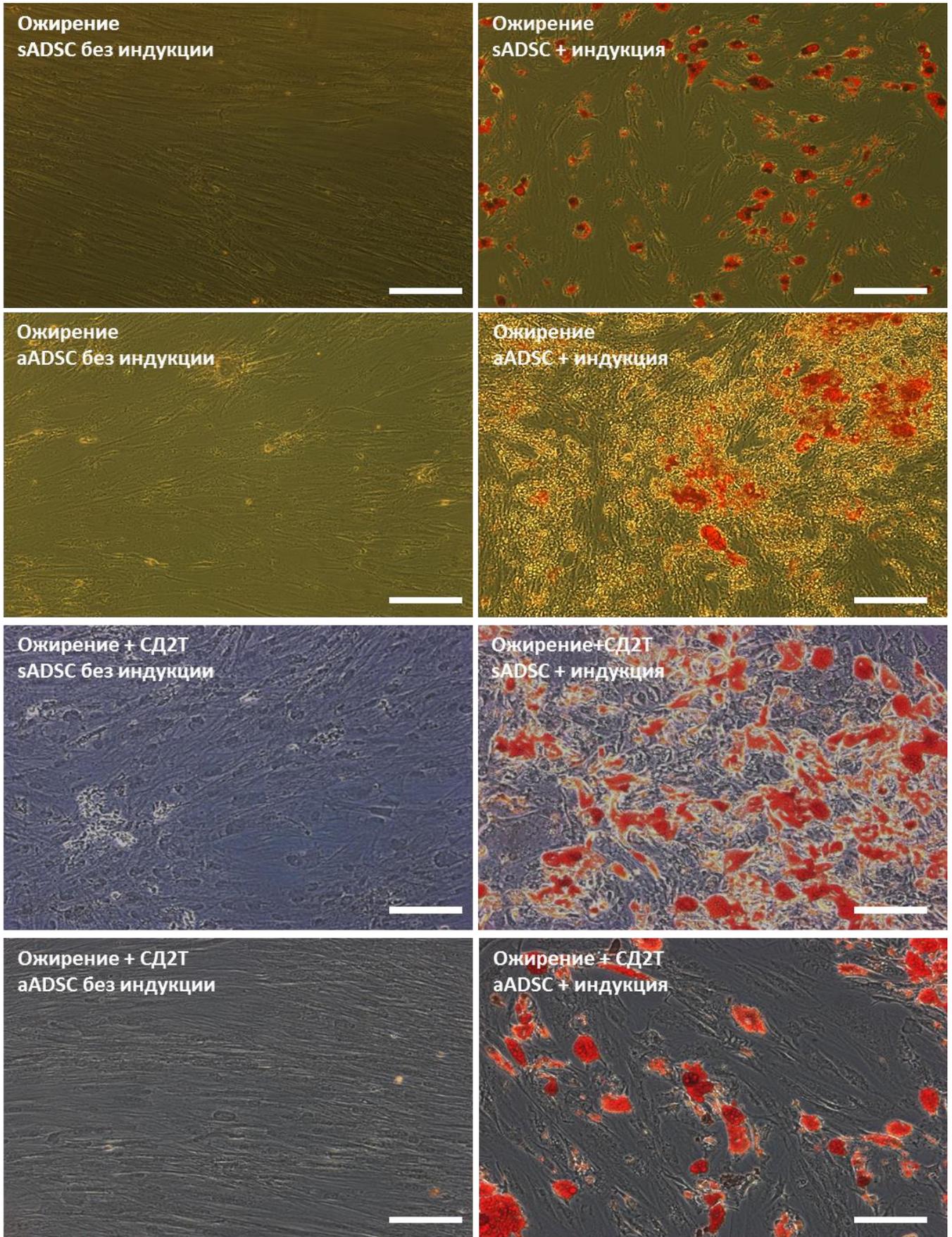


Рис.7. Сравнительная морфологическая оценка накопления липидных капель МСК ЖТ пациентов с ожирением и наличием/отсутствием СД2Т. На рисунке представлены репрезентативные фотографии окрашивания клеток на 21 день адипоцитарной дифференцировки красителем OilRedO. sADSC – МСК подкожной жировой ткани, aADSC – МСК сальниковой жировой ткани. Световая микроскопия, масштабный отрезок 200 мкм.

Анализируя липидный состав полученных адипоцитов, можно отметить, что МСК сальниковой и подкожной жировых тканей больных с ожирением и наличием/отсутствием СД2Т не способны к спонтанной дифференцировке в адипоциты при культивировании в стандартных условиях (DMEM HG + 10% FBS), а также способны дифференцироваться в зрелые адипоциты при культивировании их в среде с индукторами адипогенеза (дексаметазон, розиглитазон, изобутилметилксантин, инсулин). Оценивая морфологию полученных адипоцитов, видно, что МСК сальниковой жировой ткани дифференцируются несколько хуже, нежели МСК подкожной жировой ткани. Обращаясь к морфологии жировых капель в полученных адипоцитах можно отметить, что адипоциты, полученные из МСК сальниковой и подкожной жировых тканей пациентов с НГТ, накапливают жировые капли в меньшем количестве, а также меньшего размера. Адипоциты, полученные из МСК сальниковой и подкожной жировых тканей пациентов с СД2Т, имеют более крупные адипоциты со значительно большим количеством жировых капель. Таким образом, можно предположить, что в адипогенной дифференцировке *in vitro* МСК сальниковой и подкожной жировых тканей пациентов с СД2Т склонны к формированию адипоцитов «гипертрофического» типа, которые отличаются большими размерами и большим количеством накопленных жировых капель, в то время как МСК сальниковой и подкожной жировых тканей пациентов с НГТ склонны к формированию адипоцитов «гиперпластического» типа, которые отличаются меньшими размерами и небольшим количеством жировых капель.

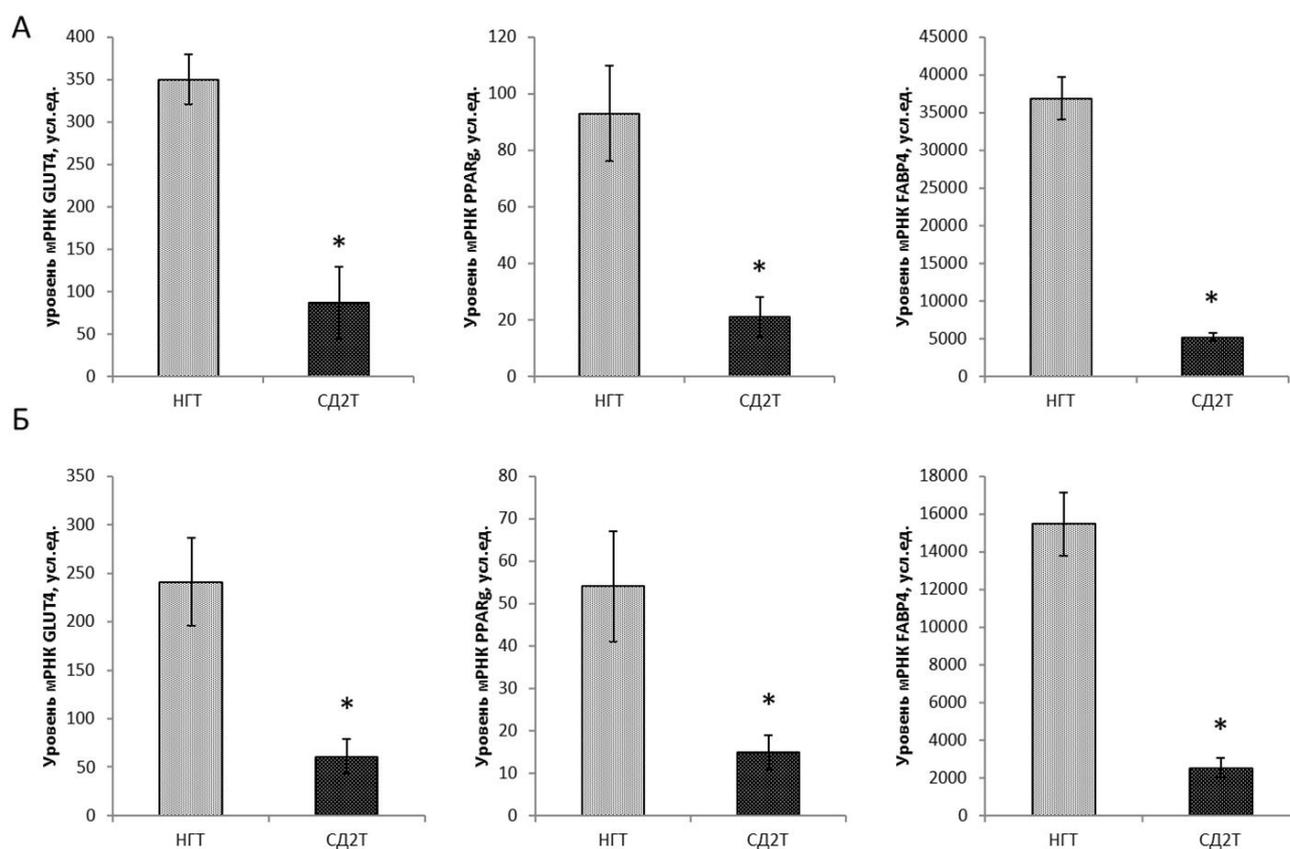


Рис.8. Экспрессия генов-маркеров адипогенеза на 21 день адипогенной дифференцировки. А – экспрессия адипогенных маркеров *GLUT4*, *PPARgamma* и *FABP4* в адипоцитах, полученных из МСК подкожной жировой ткани пациентов, Б – экспрессия адипогенных маркеров *GLUT4*, *PPARgamma* и *FABP4* в адипоцитах, полученных из МСК сальниковой жировой ткани пациентов. НГТ – нормальная толерантность к глюкозе, СД2Т – сахарный диабет 2 типа. Данные представлены в формате среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего, \*  $p < 0.01$ , критерий Манна-Уитни.

На Рис.8. представлены результаты измерения экспрессии генов-маркеров адипогенной дифференцировки в МСК ЖТ в исследуемой группе. Анализируя результаты количественного анализа экспрессии генов-маркеров адипогенной дифференцировки стоит отметить, что все МСК подкожной жировой ткани действительно способны к адипогенной дифференцировке (минимальный рост экспрессии гена-маркера составил рост экспрессии *PPARgamma* в 20 раз для МСК ЖТ пациентов с СД2Т). Тем не менее, для всех исследованных генов-

маркеров адипогенной дифференцировки (*GLUT4*, *PPARgamma*, *FABP4*) наблюдается сниженная экспрессия в МСК ЖТ пациентов с СД2Т. Экспрессия маркера снижена в МСК ЖТ пациентов с СД2Т по сравнению с НГТ в 4.3, 4.8 и 9 раз для *GLUT4*, *PPARgamma* и *FABP4* соответственно.

Суммируя данные по морфологии дифференцированных адипоцитов, а также экспрессии генов-маркеров адипогенеза, можно отметить, что МСК ЖТ пациентов с СД2Т формируют адипоциты «гипертрофического типа» со сниженной экспрессией генов-маркеров адипогенеза (показано только для МСК подкожной жировой ткани), в то время как МСК ЖТ пациентов с НГТ формируют адипоциты «гиперпластического» типа.

### ***3.10. Влияние агентов, индуцирующих метаболический стресс, на инсулиновую чувствительность и воспалительный статус зрелых адипоцитов.***

В нашей работе моделировали следующие условия метаболического стресса: классическая активация острого воспаления, гиперлипидемия, стресс, ЭПР, активация клеточного ответа на гипоксию. Активацию воспалительного ответа в адипоцитах 3T3-L1 проводили с помощью бактериального липополисахарида. Условия гиперлипидемии создавали путем инкубации клеток в присутствии конъюгата пальмитиновой кислоты с БСА. Стресс ЭПР индуцировали с помощью брефелдина А, нарушающего функционирование комплекса Гольджи. Клеточный ответ на гипоксию стимулировали путем стабилизации транскрипционного фактора HIF1 $\alpha$  в присутствии ионов двухвалентного кобальта.

После моделирования метаболического стресса проводили оценку инсулиновой чувствительности зрелых адипоцитов 3T3-L1.

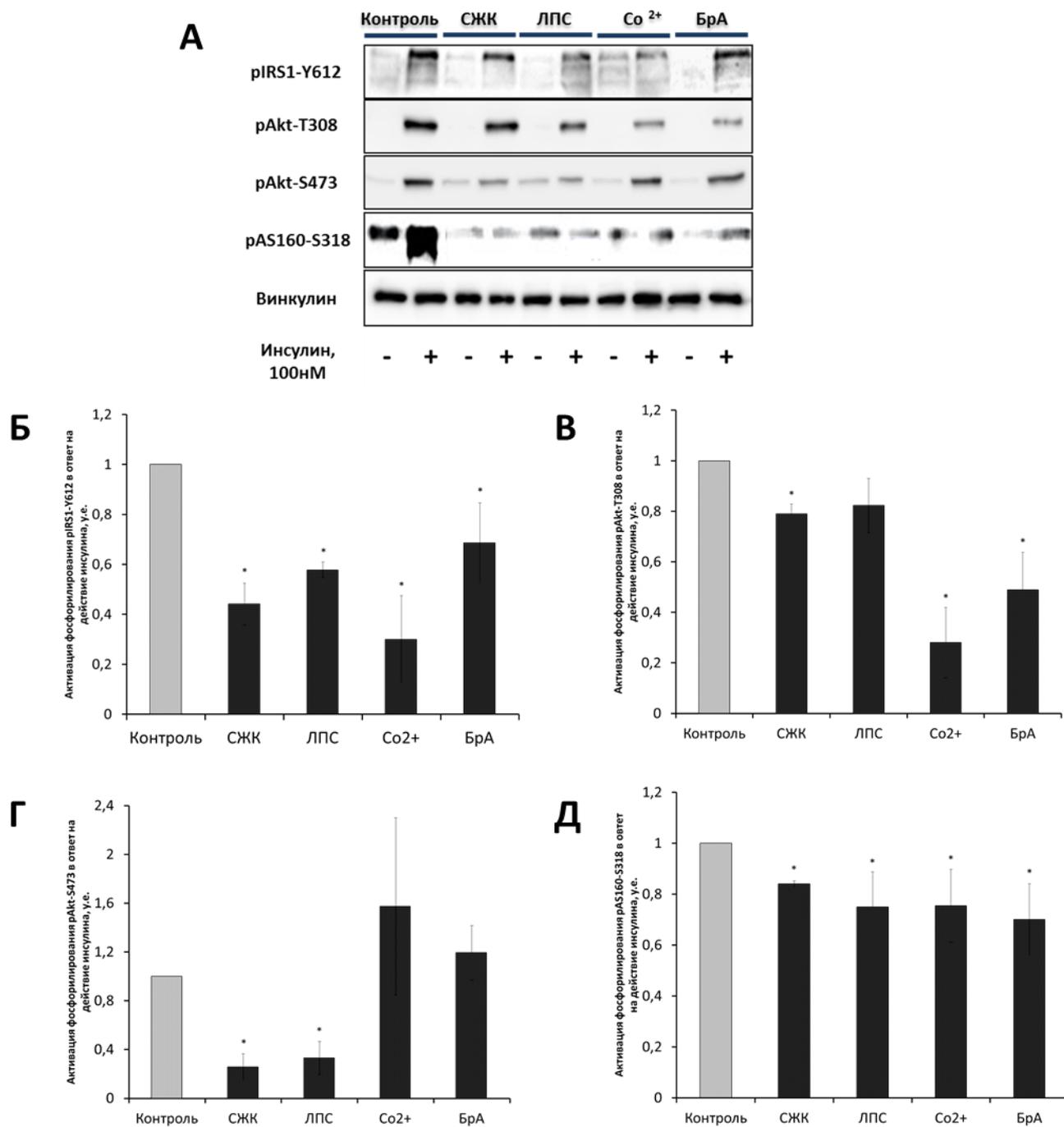
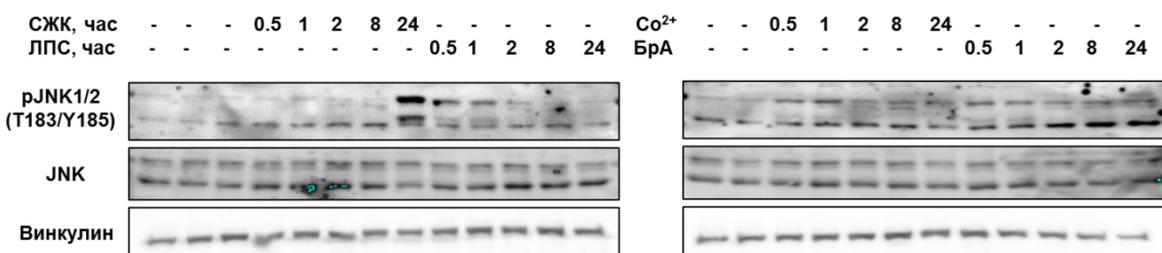


Рис.9. Состояние инсулиновой сигнализации в зрелых адипоцитах 3T3-L1 при использовании разных моделей метаболического стресса. А - панель репрезентативных иммуноблоттингов, отражающих состояние инсулиновой сигнализации, Б - денситометрия степени фосфорилирования pIRS1-Y612, В - денситометрия степени фосфорилирования pAkt-T308, Г - денситометрия степени фосфорилирования pAkt-S473, Д - денситометрия степени фосфорилирования pAS160-S318, \* p<0.01, критерий Стьюдента. СЖК –

свободные жирные кислоты, ЛПС – бактериальный липополисахарид, БрА – брэфелдин А.

В ходе работы продемонстрировано, что все используемые модели метаболического стресса супрессируют большинство активирующих фосфорилирований основных участников инсулиновой сигнализации (Рис.9.). Тем не менее, статистически значимо супрессию активирующего фосфорилирования всех рассмотренных участников инсулиновой сигнализации выполняют только свободные жирные кислоты (СЖК). Использование ЛПС статистически значимо не супрессирует фосфорилирование pAkt-T308, использование  $Co^{2+}$  - фосфорилирование pAkt-S473, использование брэфелдина А – pAkt-S473. Для выбора наиболее адекватной модели инсулиновой резистентности, сопровождающейся латентным воспалением, помимо действия индукторов метаболического стресса на состояние инсулинового сигнального каскада, мы проверили действие индукторов на активирующее фосфорилирование стресс-активируемой киназы JNK.

**А**



**Б**

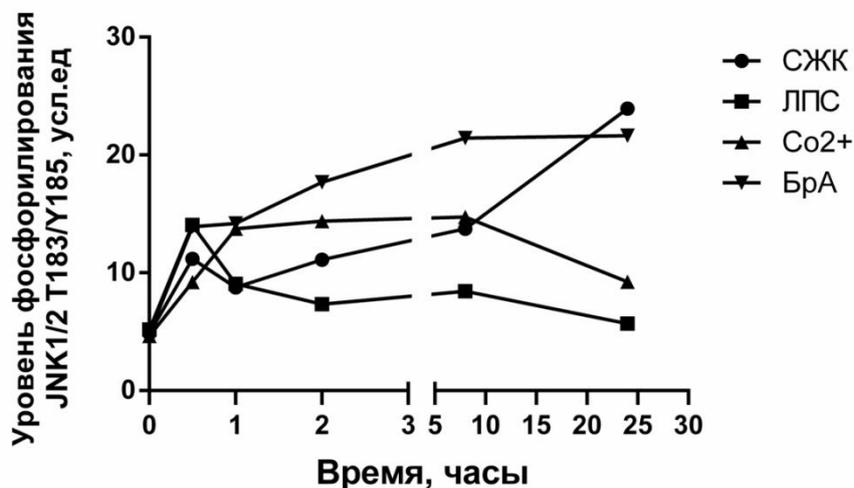


Рис.10. Кинетика фосфорилирования стресс-активируемой киназы JNK1/2 при моделировании метаболического стресса различными способами. А – панель репрезентативных иммуноблоттингов, Б – график зависимости уровня фосфорилирования JNK1/2 по сайтам T183/Y185 от времени инкубации с различными индукторами ИР.

Анализируя полученные результаты по активирующему фосфорилированию JNK, можно заключить, что СЖК и брэфелдин А можно отнести к веществам, которые способствуют латентному воспалению, при этом СЖК обладают более пологой кривой кинетики активации JNK, а брэфелдин А – более резкой (Рис.10). ЛПС как классический индуктор острого воспалительного процесса обладает быстрой кинетикой воспаления с преобладанием сильной активации JNK на небольших временах инкубации с последующим ее снижением. Похожий тип кинетики активации JNK характерен и для  $Co_2+$  (Рис.10).

Анализируя результаты, можно заключить, что модель липид-индуцируемого метаболического стресса (в данном случае – и модель инсулиновой резистентности) с использованием СЖК является наиболее физиологичной, стабильно ухудшающей состояние всех исследуемых участников инсулиновой сигнализации (Рис.9), при этом стимулирующей развитие латентного воспаления через фосфорилирование стресс-активируемых киназ с соответствующей кинетикой активации киназ. Поэтому, в дальнейших исследованиях возможностей коррекции ИР мы использовали модель липид-индуцируемой ИР.

### ***3.11. Обработка инсулинорезистентных зрелых адипоцитов 3T3-L1 рекомбинантным ИЛ-4 в концентрации 50 нг/мл восстанавливает инсулиновую чувствительность зрелых адипоцитов***

В качестве молекулы-кандидата для восстановления инсулиновой сигнализации адипоцитов нами был выбран противовоспалительный цитокин ИЛ-4. В нашей работе мы стимулировали нарушение инсулиновой сигнализации в зрелых

адипоцитах с помощью суточной инкубации клеток с конъюгатом БСА-ПК, также на эти же сутки к клеткам добавляли рекомбинантный ИЛ-4 (каталожный номер I1020, фирма Sigma Aldrich) в концентрациях 25 нг/мл, 50 нг/мл и 100 нг/мл. Далее клетки лизировали и анализировали инсулиновую сигнализацию методом иммуноблоттинга.

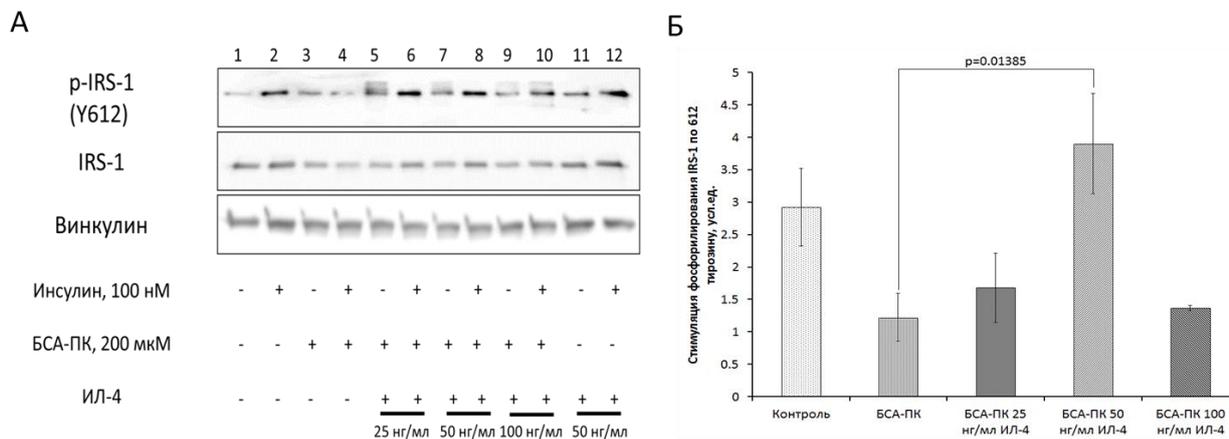


Рис.11. ИЛ-4 усиливает инсулин-зависимое фосфорилирование IRS-1 по тирозину-612 в адипоцитах 3Т3-L1 в условиях экспериментальной липид-индуцированной ИР. А, – репрезентативные результаты вестерн-блоттинга; Б, – результаты статистического анализа стимуляции фосфорилирования IRS-1 по Тир-612 инсулином в 3-х независимых экспериментах. БСА-ПК – конъюгат БСА и пальмитиновой кислоты. На гистограммах приведены средние значения  $\pm$  стандартное отклонение, критерий Стьюдента.

Прежде всего, мы определили, как ИЛ-4 влияет на первые этапы инсулиновой сигнализации в стандартной модели липид-индуцированного нарушения инсулиновой сигнализации. На Рис.11 показано, что в нормальных условиях инсулин примерно в 3 раза стимулирует фосфорилирование IRS-1, но практически не влияет на это фосфорилирование в клетках, обработанных БСА-ПК ( $p=0.0199$  по сравнению с контролем без БСА-ПК). Эти результаты означают, что БСА-ПК эффективно вызывает ИР в адипоцитах 3Т3-L1.

Активация воспалительного каскада считается важным механизмом развития ИР в условиях жировой перегрузки. Для того чтобы выяснить возможность восстановления активации инсулинового каскада в условиях ИР, мы

исследовали влияние противовоспалительного цитокина ИЛ-4. В концентрации 25 нг/мл ИЛ-4 не оказывал статистически значимого эффекта ( $p=0.29557$ ), но в концентрации 50 нг/мл ИЛ-4 значимо восстанавливал инсулин-зависимое фосфорилирование IRS-1 по тирозину-612 ( $p=0.01385$ ) (Рис. 11А, 11Б). Дальнейшее повышение концентрации ИЛ-4 в среде роста клеток (до 100 нг/мл) оказывало обратный эффект, снижая стимулирующее действие инсулина на фосфорилирование Тир-612 в IRS-1 (см. Рис. 11Б). Однако, это было связано с возрастанием базального (инсулин-независимого) фосфорилирования IRS-1, которое становилось сопоставимым с инсулин-зависимым фосфорилированием IRS-1, восстановленным до контрольного уровня под действием ИЛ-4 (Рис. 11А). Интересно, что аналогичный эффект ИЛ-4 наблюдался и в контрольных клетках, не обработанных БСА-ПК: ИЛ-4 усиливал базальное фосфорилирование Тир-612 уже в концентрации 50 нг/мл до уровня, но практически не влиял на инсулин-зависимое фосфорилирование IRS-1 (Рис. 11А, справа). По всей видимости, последнее является уже максимальным и более не увеличивается под действием ИЛ-4. В высоких концентрациях (50-100 нг/мл) ИЛ-4 повышал базальное фосфорилирование IRS-1 и восстанавливал инсулин-зависимое фосфорилирование IRS-1 до максимального уровня, тем самым снижая соотношение уровня стимулированного фосфорилирования Тир-612 к нестимулированному и, формально, степень активации IRS-1 инсулином. Таким образом, представленные результаты означают, что ИЛ-4 эффективно усиливает тирозинное фосфорилирование IRS-1 в адипоцитах 3T3-L1, и в концентрации 50 нг/мл восстанавливает способность инсулина стимулировать это фосфорилирование в условиях экспериментальной липид-индуцированной ИР.

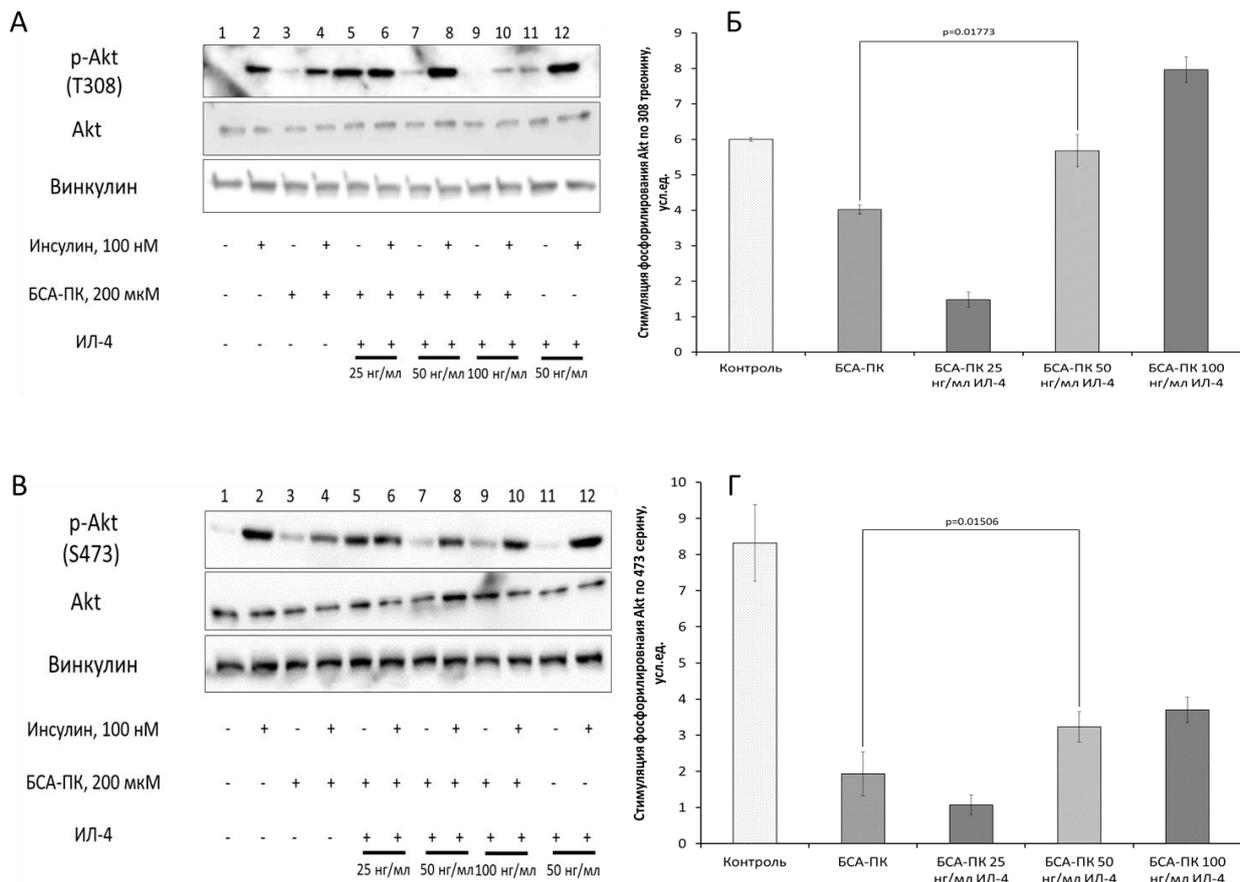


Рис.12. ИЛ-4 восстанавливает инсулин-зависимое фосфорилирование Akt в адипоцитах 3Т3-L1 в условиях липид-индуцированной ИР. А и Б – изменения уровня фосфорилирования Akt по остатку Thr-308. А – репрезентативный иммуноблоттинг, Б – результаты статистического анализа стимуляции фосфорилирования Akt по Thr-308 в 3-х независимых экспериментах. В и Г – изменения уровня фосфорилирования Akt по остатку Ser-473. В – репрезентативный иммуноблоттинг, Г – результаты статистического анализа стимуляции фосфорилирования Akt по Ser-473 в 3-х независимых экспериментах. На гистограммах приведены средние значения  $\pm$  стандартное отклонение, критерий Стьюдента.

Для того, чтобы выяснить, как ИЛ-4 влияет на активность промежуточных этапов передачи инсулинового сигнала, мы исследовали фосфорилирование Akt по обоим активационным остаткам. На Рис. 12А, 12Б показаны изменения фосфорилирования Akt по остатку Thr-308, наиболее критичному для активации Akt. В нормальных условиях инсулин стимулировал это

фосфорилирование в 6 раз, тогда как в условиях липид-индуцированной ИР стимуляция снижалась до 4-кратной ( $p=0.00023$ ). На Рис. 12В, 12Г показаны изменения фосфорилирования Akt по дополнительному активационному остатку Ser-473. В этом случае стимуляция инсулином была 8-9-кратной в контроле и снижалась до 2-кратной в условиях ИР ( $p=0.00018$ ). В совокупности, эти результаты показывают, что способность инсулина активировать PI3-киназный каскад и фосфорилирование его главной мишени, киназы Akt, существенно снижается в условиях ИР.

В условиях липид-индуцированной ИР, ИЛ-4 оказывал активирующее воздействие на фосфорилирование Akt как по остатку Thr-308 (Рис. 12А, 12Б), так и по остатку Ser-473 (Рис. 12В, 12Г). При этом, эффект ИЛ-4 был неравномерным. Так, в низких концентрациях ИЛ-4 (25 нг/мл), формально рассчитанная стимуляция фосфорилирования Akt инсулином была существенно ниже, чем в отсутствие ИЛ-4, и не превышала 1,5 раз. Однако ИЛ-4 усиливал как базальное, так и инсулин-зависимое фосфорилирование Akt так, что различия между этими значениями практически исчезали. Как и в случае с Tyr-612 в IRS-1, можно предположить, что эти значения отражают максимальный уровень фосфорилирования Akt. Напротив, при более высоких концентрациях (50 и 100 нг/мл), ИЛ-4 не изменял базального фосфорилирования Akt, но усиливал инсулин-зависимое фосфорилирование Akt предположительно до максимального уровня, т.е. сопоставимого с таковым в контроле без ИР (Рис. 12А и 12В). Как следствие, в условиях ИР ИЛ-4 полностью восстанавливал стимуляцию фосфорилирования Thr-308 инсулином до нормального уровня без ИР (Рис. 12Б), и увеличивал стимуляцию фосфорилирования Ser-473 инсулином примерно в 2 раза (Рис. 12Г). Следует также отметить, что в концентрации 50 нг/мл ИЛ-4 не изменял профиля фосфорилирования Akt в отсутствие ИР (Рис. 12А и 12В, справа).

Таким образом, ИЛ-4 восстанавливает способность инсулина активировать PI3-киназный каскад и фосфорилирование Akt в условиях липид-индуцированной ИР в адипоцитах 3T3-L1. Концентрация 50 нг/мл ИЛ-4 является оптимальной для развития максимального эффекта.

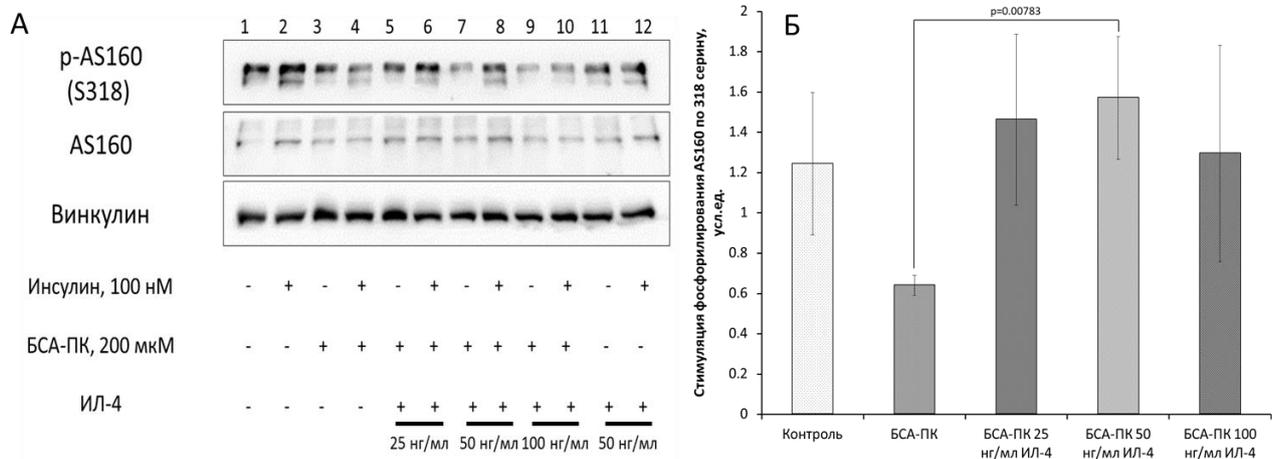


Рис.13. ИЛ-4 усиливает инсулин-зависимое фосфорилирование AS160 по серину-318 в адипоцитах 3T3-L1 в условиях липид-индуцированной ИР. А – репрезентативные результаты вестерн-блоттинга; Б – результаты статистического анализа стимуляции фосфорилирования AS160 по Ser-318 инсулином в 3-х независимых экспериментах. На гистограммах приведены средние значения  $\pm$  стандартное отклонение, критерий Стьюдента.

Фосфорилируя AS160, Akt запускает выход инсулин-зависимого глюкозного транспортера GLUT4 на клеточную мембрану и транспорт глюкозы в клетки. Анализ фосфорилирования ключевого остатка Ser-318 в AS160 показал, что в адипоцитах 3T3-L1 инсулин стимулирует его фосфорилирование лишь незначительно (в 1,2 раза, Рис.12). Это может быть связано с наличием нескольких участков, фосфорилируемых Akt в AS-160, и имеющих разную чувствительность к инсулину. Однако, в условиях ИР стимуляция фосфорилирования Ser-318 инсулином нарушалась и достоверно снижалась примерно в 2 раза ( $p=0.04043$ ) (Рис. 13Б). В условиях экспериментальной ИР, ИЛ-4 усиливал инсулин-зависимое фосфорилирование Ser-318 в AS160, не повышая базального фосфорилирования этого остатка (Рис. 13А). В присутствии 25 и 50 нг/мл ИЛ-4 инсулин стимулировал фосфорилирование AS-

160 примерно в 1,5 раза, что выше контрольных значений в отсутствие ИР (Рис. 13Б). В концентрациях 25 и 50 нг/мл эффект ИЛ-4 был статистически значимым по сравнению с контролем без ИР ( $p=0.02961$  и  $p=0.00783$ , соответственно), тогда как в концентрации 100 нг/мл эффект ИЛ-4 был недостоверным ( $p=0.09212$ ). В отсутствие ИР обработка клеток ИЛ-4 в концентрации 50 нг/мл не изменяла профиля фосфорилирования AS160 по остатку Ser-318 (Рис. 13А, справа).

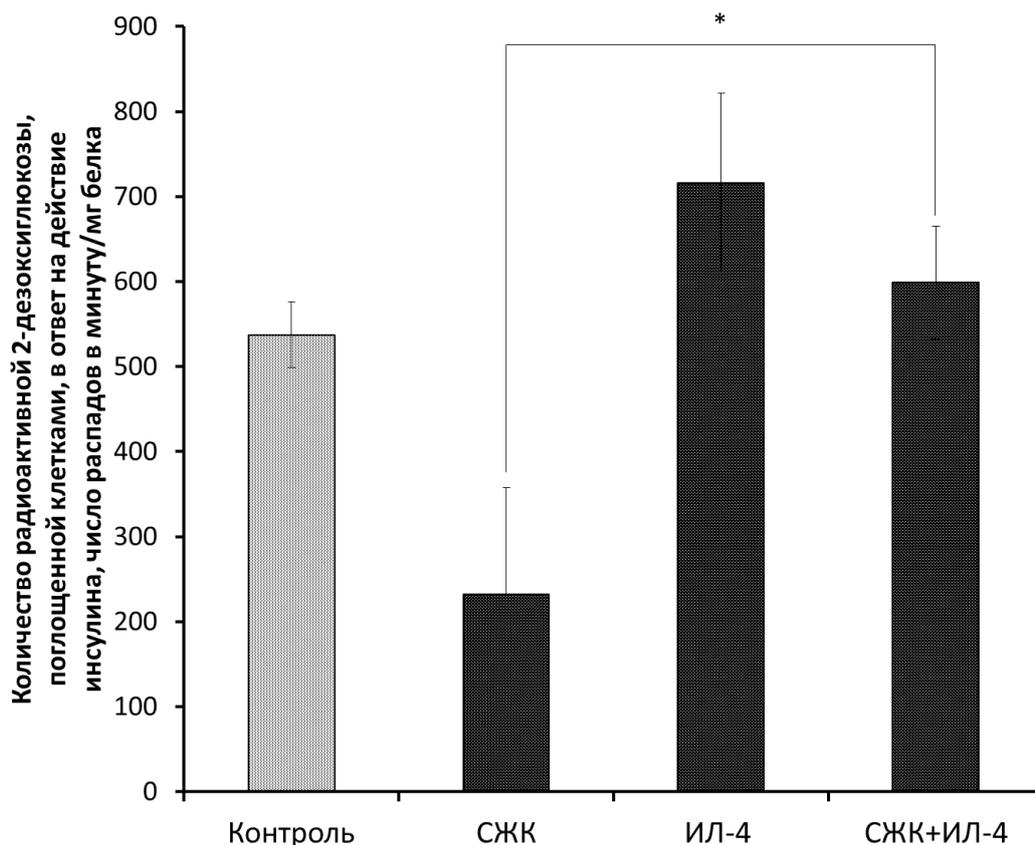


Рис.14. ИЛ-4 в концентрации 50 нг/мл восстанавливает способность клеток поглощать глюкозу в ответ на действие инсулина даже в присутствии свободных жирных кислот. СЖК – свободные жирные кислоты. \*  $p<0.01$ , критерий Стьюдента.

Кроме того, в ходе нашей работы было продемонстрировано, что ИЛ-4 не только улучшает инсулиновую сигнализацию в составе зрелых адипоцитов 3T3-L1, но и полностью восстанавливает способность адипоцитов к инсулин-индуцируемому захвату глюкозы (Рис.14). Добавление свободных жирных кислот в 2 раза снижает способность зрелых адипоцитов к инсулин-

индуцируемому захвату глюкозы, в то время как добавление ИЛ-4 восстанавливает эту способность до уровня контроля (Рис.14.).

Таким образом, ИЛ-4 восстанавливает инсулиновую чувствительность в адипоцитах в условиях липид-индуцированной ИР в адипоцитах 3T3-L1. При этом концентрации 25 и 50 нг/мл ИЛ-4 являются достаточными для развития максимального эффекта.

### ***3.12. Обработка дифференцирующихся преадипоцитов 3T3-L1 не влияет на эффективность адипоцитарной дифференцировки***

Адипогенную дифференцировку преадипоцитов классически оценивают по окрашиванию клеток после дифференцировки липофильным красителем OilRedO. Поэтому степень дифференцировки определяли на 10-й день, окрашивая жировые капли липофильным красителем OilRedO и далее экстрагируя краситель изопропанолом для количественной оценки.

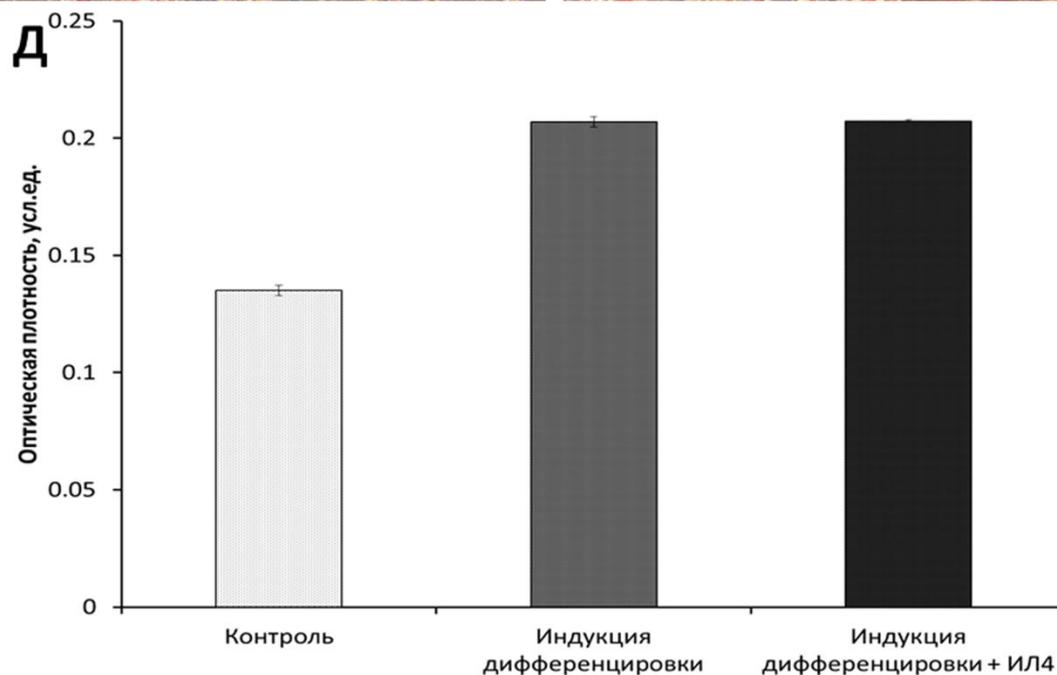
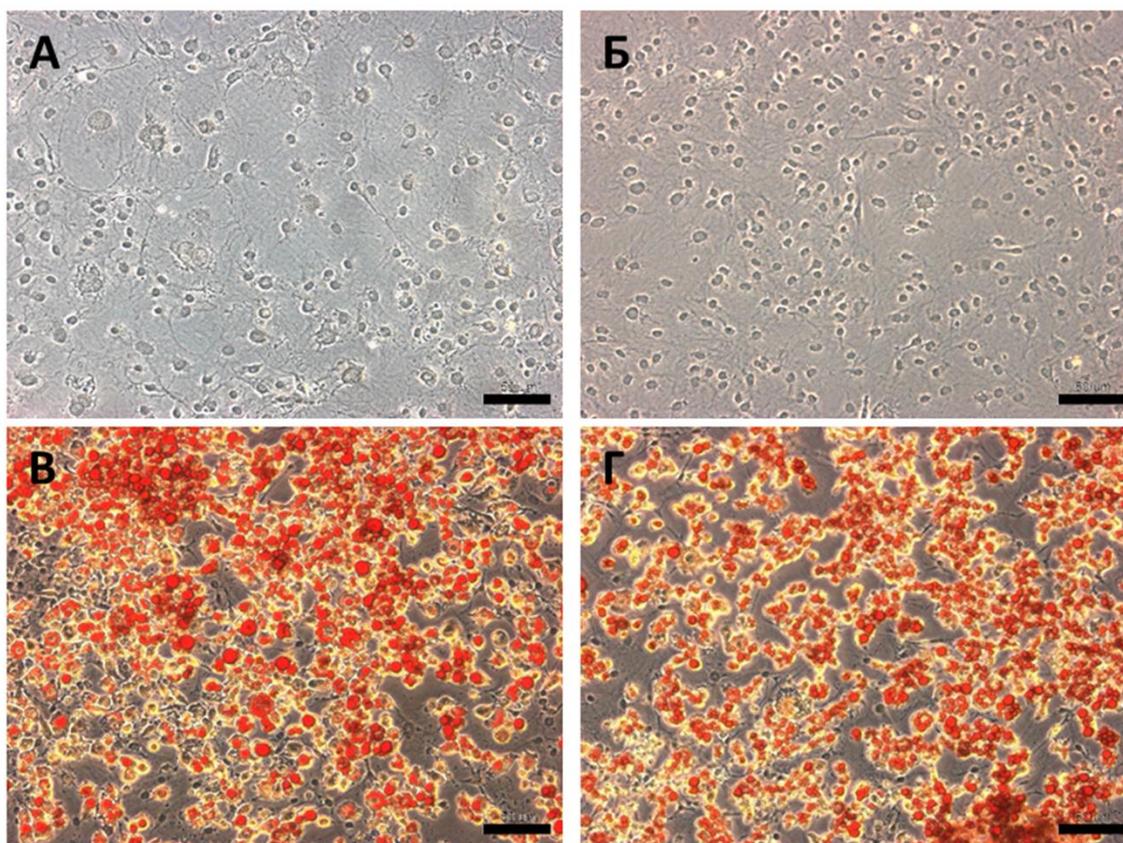


Рис.15. ИЛ-4 не влияет на адипогенную дифференцировку преадипоцитов 3Т3-Л1. А-Г – фазово-контрастная микроскопия культур клеток 3Т3-Л1 без индукции адипогенной дифференцировки в отсутствие (А) или в присутствии (Б) 50 нг/мл ИЛ-4, и на 10-й день после начала адипогенной дифференцировки в отсутствие (В) или в присутствии (Г) 50 нг/мл ИЛ-4; все клеточные культуры

окрашены липофильным красителем OilRedO. Д – результат количественного анализа накопления нейтральных липидов на 10-й день после начала дифференцировки. Приведена оптическая плотность экстракта OilRedO, измеренная при длине волны 600 нм. Контроль соответствует усредненным данным из А и Б вместе. На гистограммах приведены средние значения  $\pm$  стандартное отклонение.

По данным световой микроскопии, в концентрации 50 нг/мл ИЛ-4 не вызывал накопления нейтральных липидов в культуре преадипоцитов (Рис. 15А, 15Б). К 10-му дню дифференцировки около 80% клеток 3Т3-L1 содержали нейтральные липиды, окрашиваемые OilRedO, независимо от того, присутствовал ли ИЛ-4 в среде роста на протяжении всего срока дифференцировки, или нет (Рис. 15В, 15Г). Количественный анализ экстрагированного из клеток OilRedO также не выявил различий между клетками, дифференцированными в отсутствие или в присутствии OilRedO (Рис. 15Д). Вместе с тем, преадипоциты, культивированные без индукции дифференцировки в течение 10 дней содержали в 2 раза меньше липофильного красителя, чем клетки после адипогенной дифференцировки (Рис. 15Д, контроль). Эти результаты означают, что ИЛ-4 не стимулирует накопления нейтральных липидов в клетках 3Т3-L1, по крайней мере, в концентрации 50 нг/мл. По-видимому, это связано с тем, что ИЛ-4 не способен стимулировать адипогенную дифференцировку.

Анализируя данные по накоплению OilRedO, мы можем лишь ответить на вопрос, дифференцированы ли клетки на 10 день. При действии ИЛ-4, возможно, могут иметь место различия в кинетике адипогенной дифференцировки. Для того, чтобы доказать неспособность ИЛ-4 влиять на скорость адипогенной дифференцировки, мы определили уровень мРНК генов-маркеров адипогенеза GLUT4 и PPAR $\gamma$  в процессе адипогенной дифференцировки клеток 3Т3-L1, проведенной в отсутствие или в присутствии 50 нг/мл ИЛ-4.

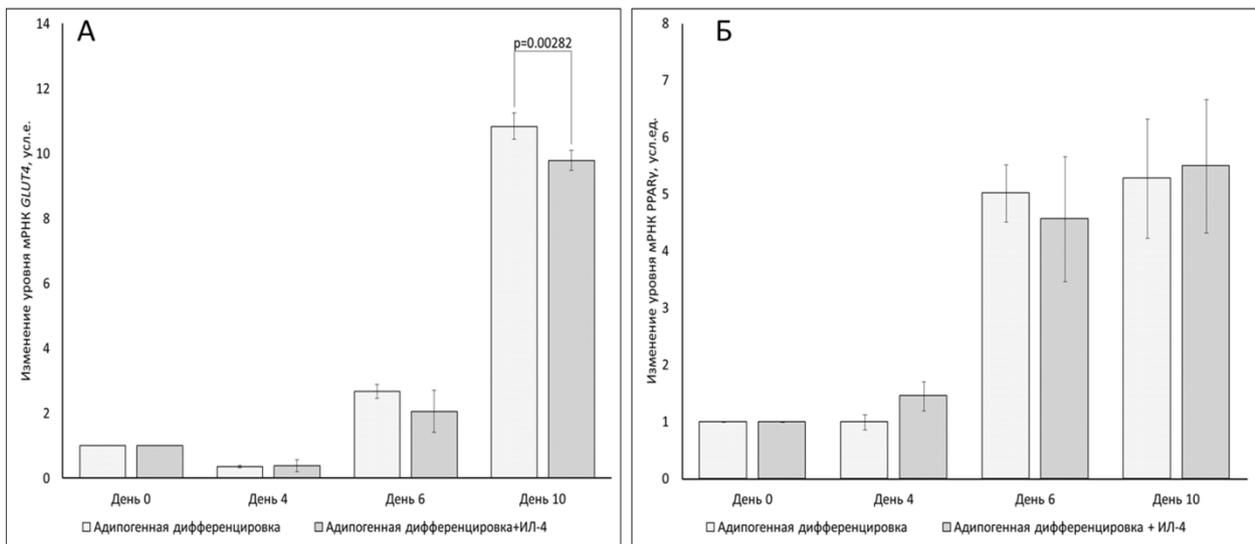


Рис.16. Влияние ИЛ-4 на уровень мРНК генов-маркеров адипогенной дифференцировки в адипоцитах 3Т3-Л1. Показаны результаты ПЦР в реальном времени для 3-х независимых экспериментов. Адипогенную дифференцировку клеток 3Т3-Л1 проводили в течение разного времени, в отсутствие или в присутствии 50 нг/мл ИЛ-4, как указано. А – изменение уровня мРНК *GLUT4*, Б – изменение уровня мРНК *PPARγ*. На гистограммах приведены средние значения  $\pm$  стандартное отклонение.

Как и ожидалось, экспрессия генов *GLUT4* и *PPARγ* значительно возросла, начиная с 6-го дня адипогенной дифференцировки клеток 3Т3-Л1 (Рис. 16). Однако мы не обнаружили существенных различий в содержании мРНК *GLUT4* (Рис. 16А) или *PPARγ* (Рис. 16Б) между клетками, дифференцированными в отсутствие или в присутствии 50 нг/мл ИЛ-4. Лишь на 10 день удалось обнаружить незначительное, но статистически достоверное уменьшение уровня мРНК *GLUT4*, в клетках, дифференцированных в присутствии ИЛ-4 ( $p=0.00282$ ). В целом, эти результаты согласуются с данными по накоплению нейтральных липидов и позволяют заключить, что ИЛ-4 не вызывает и не ускоряет адипогенную дифференцировку клеток 3Т3-Л1.

### ***3.13. Зрелые адипоциты 3Т3-Л1, трансдуцированные лентивирусом, кодирующим ИЛ-4, экспрессируют и секретируют ИЛ-4***

Полученные рекомбинантные лентивирусы, несущие ген ИЛ-4 мыши, были использованы нами для получения модифицированных адипоцитов 3T3-L1.

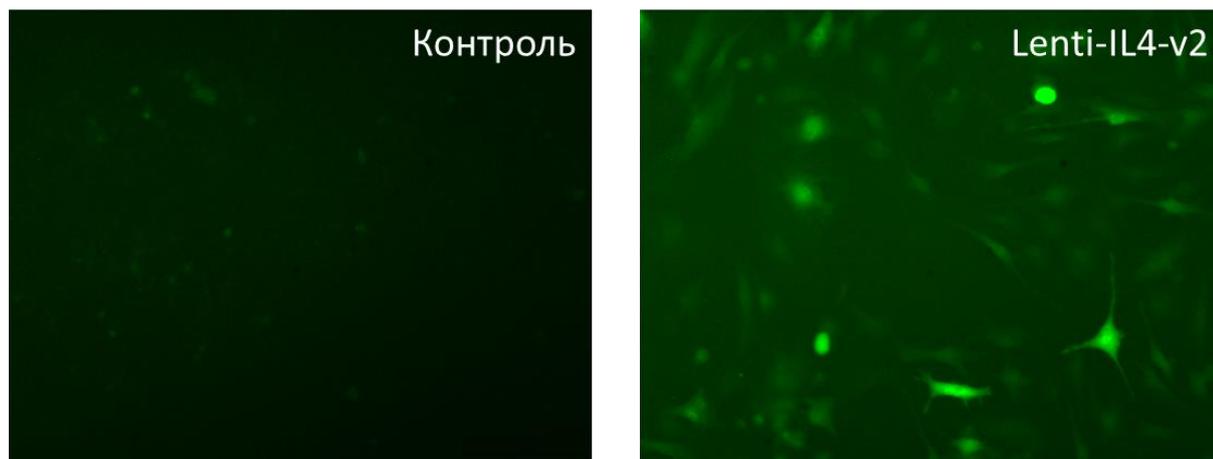


Рис.17. Флуоресцентная микроскопия адипоцитов 3T3-L1, трансдуцированных Scramble вирусом и вирусом, кодирующим ИЛ-4+eGFP. Фотографии выполнены при одинаковых настройках яркости и резкости, увеличение x200. Контроль – клетки, трансдуцированные Scramble вирусом, Lenti-IL4v2 – клетки, трансдуцированные вирусом, кодирующим ИЛ-4+eGFP. Сокращения: ИЛ-4 – интерлейкин 4, eGFP – enhanced green fluorescent protein, зеленый флуоресцентный белок с усиленной флуоресценцией.

Эффективность трансдукции адипоцитов 3T3-L1 лентивирусом с геном GFP (Рис.17), определенная как доля GFP<sup>+</sup>-клеток, составила 75-85%. Некоторое зеленое свечение в контрольных клетках вызвано аутофлуоресценцией липидов в составе адипоцитов. Помимо этого, в ходе работы определяли выживаемость дифференцированных адипоцитов после лентивирусной трансдукции геном ИЛ-4.

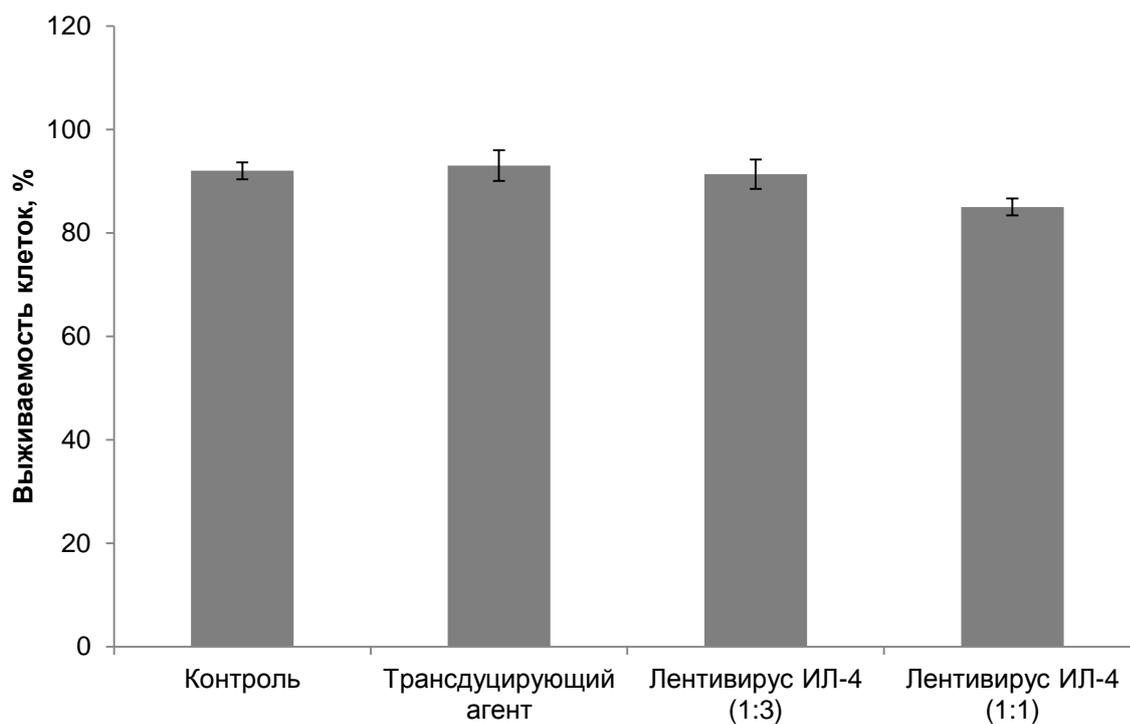


Рис.18. Процент выживших адипоцитов 3Т3-Л1 после трансдукции лентивирусом, кодирующим ИЛ-4. Контроль – клетки без заражения, трансдуцирующий агент – полибрен в концентрации 8 мкг/мл, лентивирус ИЛ-4 (1:3) – трансдукция лентивирусом в соотношении вирусный сток : среда культивирования = 1 : 3, лентивирус ИЛ-4 (1:1) – трансдукция лентивирусом в соотношении вирусный сток : среда культивирования = 1 : 1. На гистограммах приведены средние значения  $\pm$  стандартное отклонение.

Гибель клеток во время трансдукции оценивали с использованием красителя метиленового синего. При использовании соотношения вирусный сток : среда культивирования = 1 : 3 не превышала 10%, однако уровень флуоресценции GFP в таких клетках был несколько снижен по сравнению с использованием соотношения вирусный сток : среда культивирования = 1 : 1. При этом смертность клеток при соотношении 1 : 1 не превышала 15%, что мы сочли приемлемым для дальнейшей работы. Трансдуцирующий агент статистически незначимо изменяет смертность клеток в сравнении с контролем.

Следующим этапом нашей работы была оценка наработки мРНК трансгена ИЛ-4, а также нативного белка ИЛ-4. Зрелые адипоциты 3Т3-Л1 трансдуцировали

лентивирусными конструкциями в соотношении вирусный сток : среда культивирования = 1 : 1 в течение 24 часов, после чего заменяли кондиционированную среду на свежую среду культивирования и инкубировали трансдуцированные клетки в среде в течение 3 и 5 дней соответственно. Экспрессию и секрецию ИЛ-4 оценивали на 4 и 6 дни после совершения трансдукции.

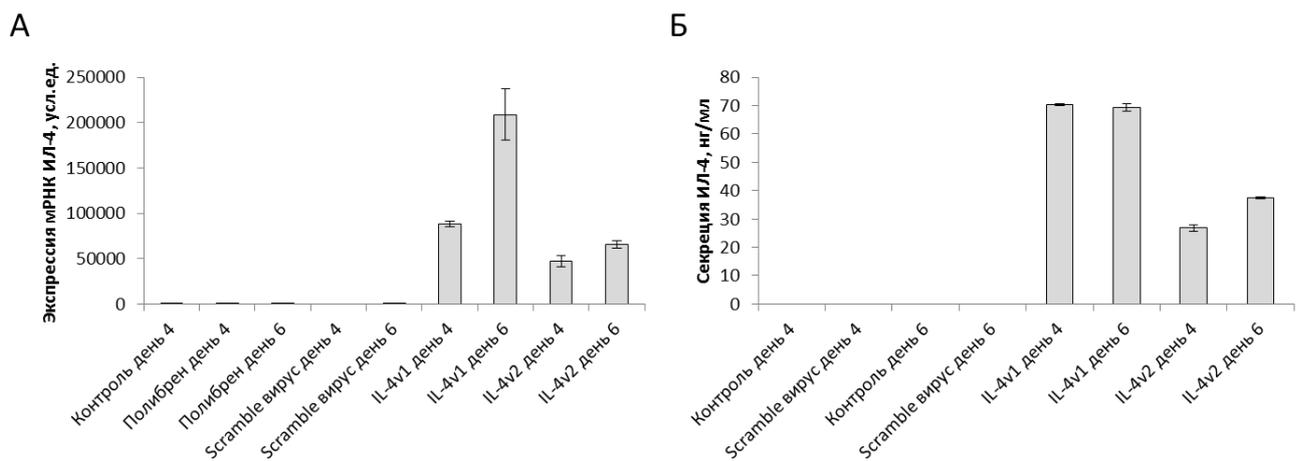


Рис.19. Экспрессия и секреция ИЛ-4 трансдуцированными адипоцитами 3Т3-Л1. А – уровень мРНК ИЛ-4, Б – концентрация нативного ИЛ-4 в кондиционированной среде. Сокращения: Полибрен – трансдуцирующий агент полибрен; Scramble вирус – пустой вирус, IL4v1 – лентивирус, кодирующий ИЛ-4; IL4v2 – лентивирус, кодирующий ИЛ-4+eGFP. На гистограммах приведены средние значения  $\pm$  стандартное отклонение.

Согласно полученным данным, незараженные адипоциты 3Т3-Л1 не экспрессируют и не секретируют ИЛ-4, добавление трансдуцирующего агента полибрен не стимулирует экспрессию и секрецию ИЛ-4 (Рис.19, левая гистограмма, столбцы Полибрен день 4, Полибрен день 6; правая гистограмма, столбцы Контроль день 4). Заражение адипоцитов пустым лентивирусом также не индуцирует экспрессию и секрецию ИЛ-4 (Рис.19, левая гистограмма, столбцы Scramble вирус день 4, Scramble вирус день 6; правая гистограмма, столбцы Scramble вирус день 4, Scramble вирус день 6). Заражение обоими вариантами вируса, кодирующими ИЛ-4, вызывает экспрессию мРНК ИЛ-4, что

показано результатам ПЦР в реальном времени. Результаты ПЦР нормировали на значение Полибрен день 4, но из-за предельно низкого уровня мРНК ИЛ-4 в этой пробе, в пробах трансдуцированных клеток наблюдаются такие большие значения роста экспрессии в цифровых значениях. Тем не менее, можно уверенно сказать, что уровень мРНК ИЛ-4 в клетках, трансдуцированных вариантом вируса с ИЛ-4 без eGFP, примерно в 3 раза выше уровня мРНК ИЛ-4 в клетках, трансдуцированных вариантом вируса с ИЛ-4+eGFP. При этом нативная форма ИЛ-4 секретируется в кондиционированную среду клетками, трансдуцированными обоими вариантами лентивирусов, кодирующих ИЛ-4. При этом секреция ИЛ-4 клетками, зараженными лентивирусом, несущим ИЛ-4+eGFP, составила 27 нг/мл и 37 нг/мл на 4 и 6 дни после трансдукции соответственно. В то же время, секреция ИЛ-4 клетками, зараженными лентивирусом, несущим ИЛ-4, составила 70 нг/мл и 69 нг/мл на 4 и 6 дни после трансдукции соответственно. Полученные данные по секреции ИЛ-4 позволяют предположить, что уровень секреции ИЛ-4 с концентрацией в кондиционированной среде 70 нг/мл является концентрацией для выхода на плато и максимальной концентрацией, которую могут секретировать трансдуцированные клетки. Позитивным моментом является также тот факт, что нарабатываемая концентрация ИЛ-4 близка к наиболее оптимальной терапевтической концентрации 50 нг/мл, эффективность которой показана в экспериментах с рекомбинантным ИЛ-4.

### ***3.14. Трансдукция зрелых адипоцитов 3T3-L1 защищает зрелые адипоциты 3T3-L1 от формирования липид-индуцированной инсулиновой резистентности***

На следующем этапе нашей работы мы оценивали восприимчивость линейных адипоцитов 3T3-L1 к формированию инсулиновой резистентности в липид-индуцируемой модели.

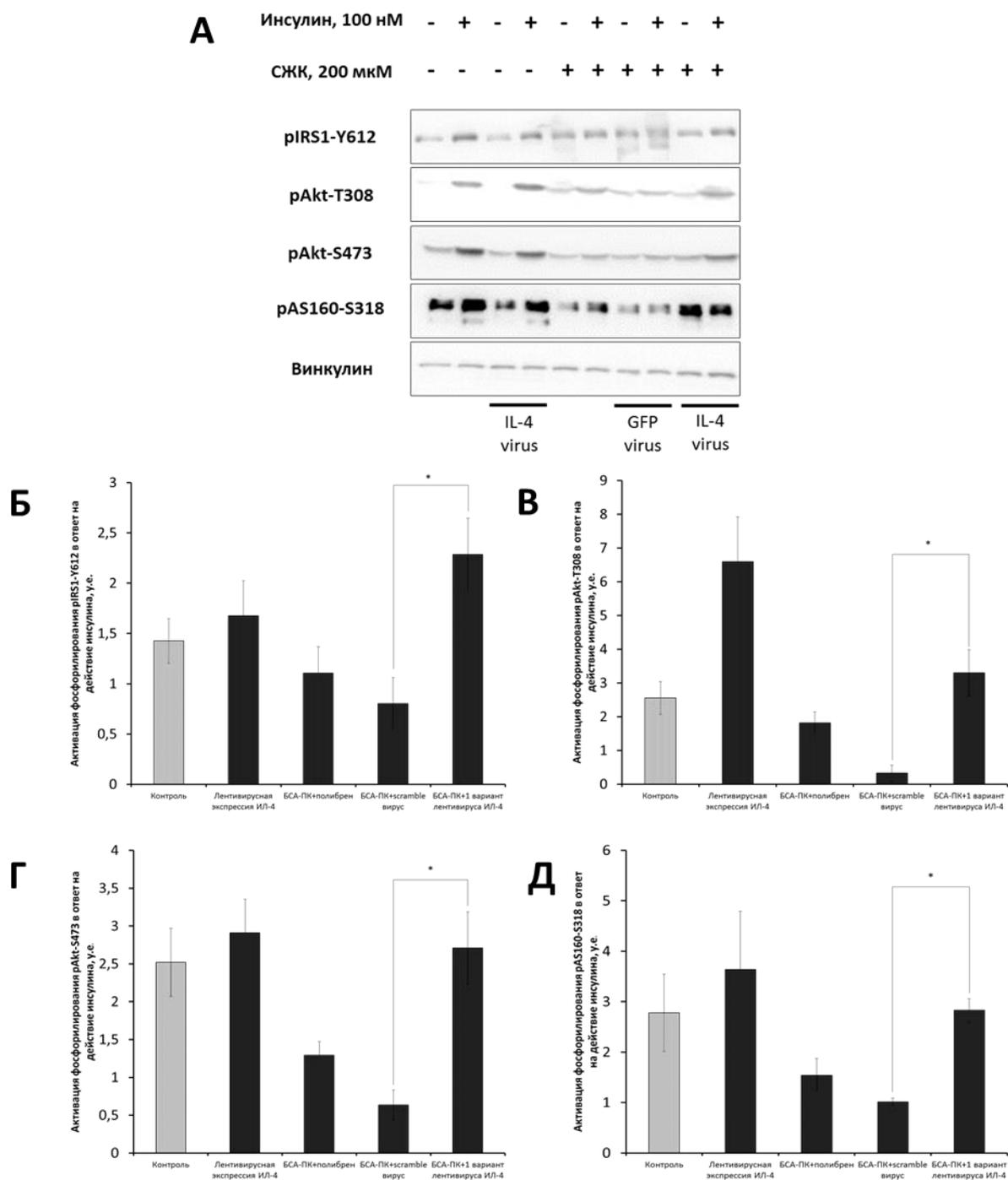


Рис.20. Фосфорилирование некоторых участников инсулиновой сигнализации в адипоцитах 3T3-L1, гиперэкспрессирующих ИЛ-4, в модели липид-индуцируемой инсулиновой резистентности. А – репрезентативный иммуноблоттинг, Б – Г – расчет уровня активации участников инсулиновой сигнализации под действием инсулина в условиях липид-индуцируемой инсулинорезистентности по результатам денситометрии, Б – pIRS1-Y612, В – pAkt-Thr308, Г – pAkt-Ser473, Д – pAS160-S318. \*  $p < 0.01$ , критерий Стьюдента.

Нами проведена оценка состояния инсулиновой сигнализации в адипоцитах, гиперэкспрессирующих ИЛ-4. В нашем эксперименте добавление инсулина к необработанным клеткам вызывает значительный подъем фосфорилирования исследуемых участников инсулиновой сигнализации (Рис.20А (дорожки 1-2), 1 столбец на Рис.20Б-20Г). Добавление свободных жирных кислот значительно снижает активацию по всем исследованным участникам инсулиновой сигнализации (Рис.20А (дорожки 5-6), 3 столбец на Рис.20Б-20Г). Клетки, гиперэкспрессирующие ИЛ-4, при добавлении свободных жирных кислот несколько увеличивают инсулин-индуцируемое фосфорилирование IRS-1 (Рис.20А (дорожки 9-10), 5 столбец на Рис.20Б), оставляют неизменным инсулин-зависимое фосфорилирование pAkt-Thr308 и pAkt-S473, (Рис.20А (дорожки 9-10), 5 столбец на Рис.20В-Г), а также фосфорилирование pAS160-S318 (Рис.20А (дорожки 9-10), 5 столбец на Рис.20Д). Однако, оценивая репрезентативный иммуноблоттинг и абсолютные значения оптической плотности каждой полосы, нормированной на винкулин, можно отметить, что фосфорилирование pIRS-Y612, pAkt-T308 и pAkt-S473, стимулированное инсулином, в клетках с гиперэкспрессией ИЛ-4 остается таким же, как и в контрольных клетках без добавления свободных жирных кислот.

Помимо анализа инсулиновой сигнализации, в ходе нашей работы был проведен анализ способности адипоцитов, гиперэкспрессирующих ИЛ-4, к инсулин-индуцируемому захвату глюкозы. Результаты продемонстрировали, что адипоциты, гиперэкспрессирующие ИЛ-4, не снижают уровень инсулин-зависимого поглощения глюкозы в модели ИР по сравнению с контрольными клетками (Рис.21).

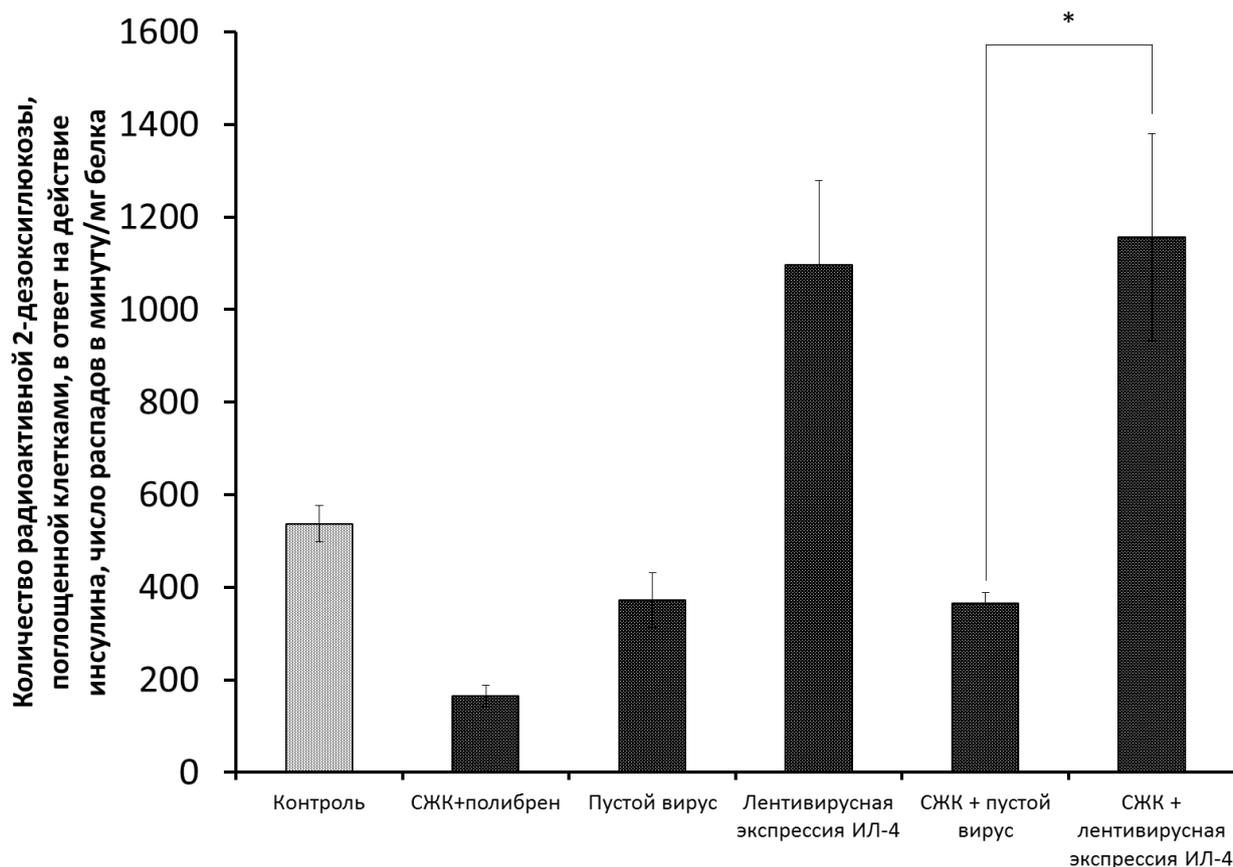


Рис.21. Лентивирусная трансдукция геном ИЛ-4 делает зрелые адипоциты 3Т3-L1 невосприимчивыми к действию СЖК на снижение инсулин-индуцированного захвата глюкозы. СЖК – свободные жирные кислоты. \*  $p < 0.01$ , критерий Стьюдента.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что стабильная экспрессия ИЛ-4 зрелыми адипоцитами 3Т3-L1 может защищать их от снижения инсулиновой чувствительности в условиях липид-индуцируемой ИР.

***3.15. Обработка зрелых адипоцитов ИЛ-4 в условиях липид-индуцированной инсулиновой резистентности стимулирует транзиторную активацию фосфорилирования транскрипционного фактора STAT6 с последующей ядерной транслокацией, а также фосфорилирование pIRS1-Y612 и pAkt-S473.***

Для понимания механизма действия ИЛ-4 на восстановление инсулиновой чувствительности зрелых адипоцитов мы провели анализ классической сигнализации, индуцируемой ИЛ-4 в иммунных клетках – активация STAT6

сигнального каскада. Для зрелых адипоцитов активация STAT6 под действием ИЛ-4 ранее не продемонстрирована в литературе.

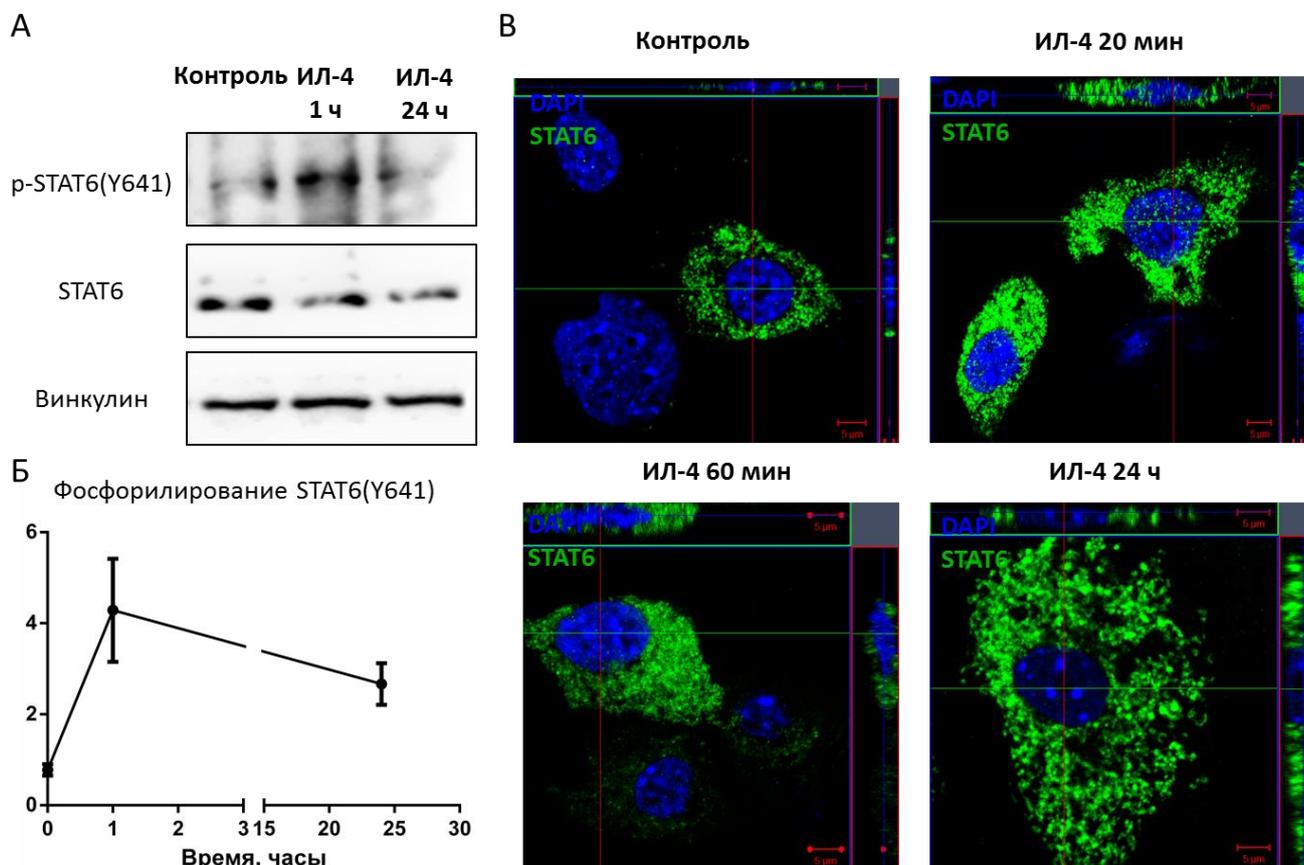


Рис.22. ИЛ-4 стимулирует активацию и транслокацию транскрипционного фактора STAT6 в ядро зрелых адипоцитов при наличии/отсутствии СЖК. А – репрезентативный иммуноблоттинг окраски лизатов клеток на pSTAT6-Y641; Б – денситометрия иммуноблоттингов окрашивания лизатов клеток на pSTAT-Y641; В – панель репрезентативных фотографий ядерной транслокации STAT6 под действием ИЛ-4 (50 нг/мл), конфокальная микроскопия.

Анализируя полученные результаты можно отметить, что добавление ИЛ-4 на 1 час стимулирует фосфорилирование pSTAT6-Y641, однако к 24 часам инкубации данный эффект исчезает (Рис.22А-Б). Обработка ИЛ-4 в течение 20 минут вызывает ядерную транслокацию STAT6, к 1 часу в ядре детектируются лишь следовые количества STAT6, а к 24 часам STAT6 детектируется только в цитоплазме клетки (Рис.22В). Полученные результаты могут свидетельствовать о том, что действие ИЛ-4 на зрелые адипоциты 3T3-L1 сопровождается

транзиторной активацией STAT6, что сопряжено, тем не менее, с долгосрочными эффектами на инсулиновую чувствительность. На следующем этапе работы мы проверили возможность активации сигнального каскада инсулина под действием ИЛ-4.

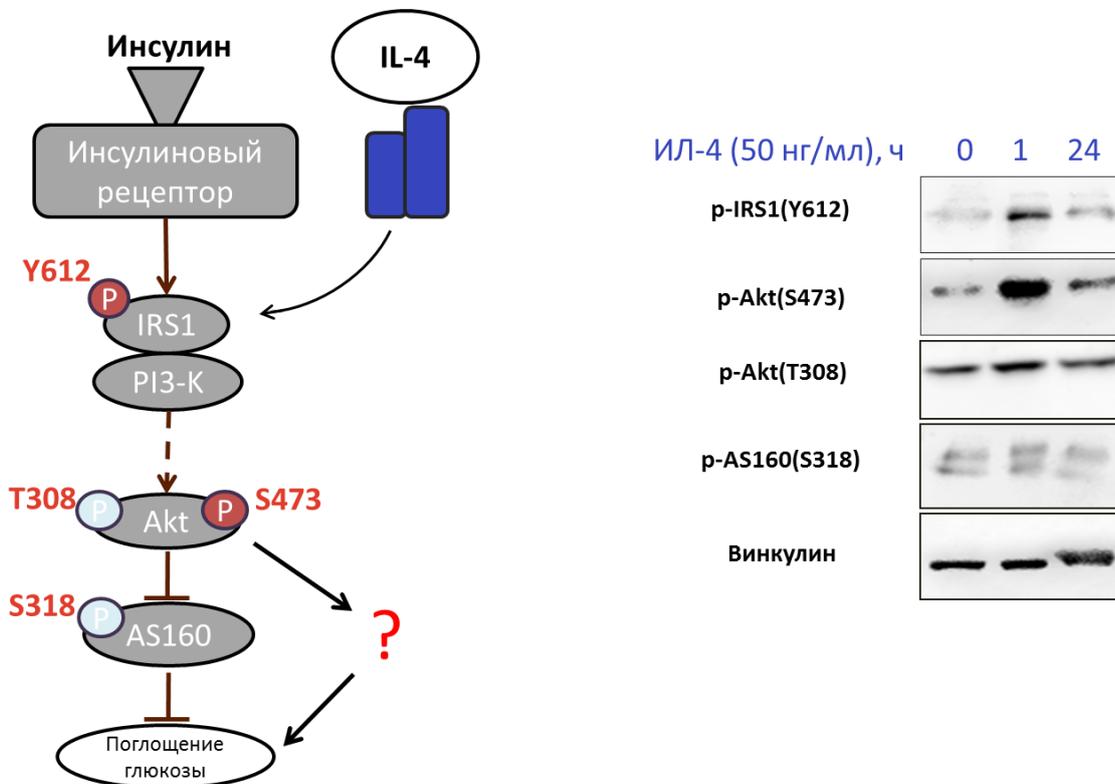


Рис.23. Репрезентативные иммуноблоттинги анализа сигнального каскада инсулина при действии ИЛ-4 на зрелые адипоциты 3Т3-L1. Представленные результаты получены в 3 независимых экспериментах.

По полученным данным, можно заметить, что ИЛ-4 активирует транзиторное фосфорилирование pIRS1-Y612 и pAkt-S473, не стимулируя при этом фосфорилирование pAkt-T308, а также pAS160-S318 – основного регулятора внутриклеточного трафика GLUT4 (Рис.23). Это позволяет говорить, что ИЛ-4 не активирует сигнальный каскад инсулина, а стимулирует иные активности Akt, не сопряженные с GLUT4. Однако, стоит отметить, что наблюдаемый эффект также является транзиторным, как в случае STAT6-зависимой сигнализации. Возможно, два проанализированных сигнальных каскада являются триггерами, опосредующими иные сигнализации или экспрессию определенных генов, которые способствуют модулированию инсулиновой

чувствительности адипоцитов. Поэтому мы анализировали, как транзиторное (1 час) и хроническое (24 часа) действия ИЛ-4 изменят протеом зрелых адипоцитов 3Т3-L1.

### 3.16. Анализ изменения протеома зрелых адипоцитов при кратком и длительном действии ИЛ-4.

Изучение влияния ИЛ-4 на протеом зрелых адипоцитов 3Т3-L1 проводили с использованием "Shotgun" масс-спектрометрического анализа. Всего для образцов адипоцитов после обработки ИЛ-4 в течение 1 часа было выявлено 82 условно значимых отличия экспрессии белков от контроля и 13 значимых отличий экспрессии белков от контроля. Для образцов адипоцитов после обработки ИЛ-4 в течение 24 часов было выявлено 110 условно значимых отличия экспрессии белков от контроля и 17 значимых отличий экспрессии белков от контроля.

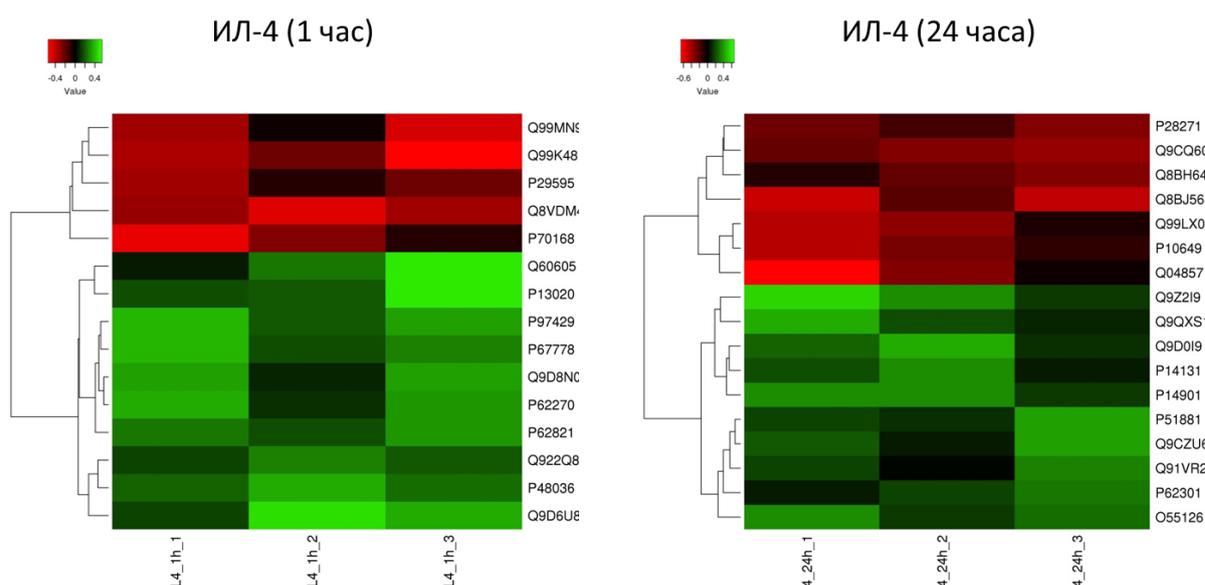


Рис.24. «Тепловые карты» белков, экспрессия которых достоверно изменяется при действии ИЛ-4. Названия белков приведены правой стороны тепловых карт в виде идентификаторов базы данных UniProt.

В ходе работы, по значимым отличиям экспрессии белков от контроля, были идентифицированы несколько гипотетических сигнальных путей, регуляция экспрессии участников которых могла быть вовлечена в реализацию эффекта ИЛ-4, в частности для протеома 3Т3-L1 при 1 часе действия ИЛ-4

обнаружено изменение белков LRRC59/импортинового каскада, который облегчает транспорт мощнейшего антидиабетического агента FGF-1 в ядро клетки, а также изменение экспрессии белка Prohibitin-1 – одного из мощных факторов митофагии. Для длительного действия ИЛ-4 (24 часа) характерна активация экспрессии ряда митохондриальных белков, а также усиление экспрессии участников цикла Кребса, что позволяет предполагать регуляцию активности митохондрий как важный эффект действия ИЛ-4 на зрелые адипоциты. Белки, экспрессия которых отличалась условно значимо от контрольного образца, были подвергнуты анализу в терминах онтологии генов.

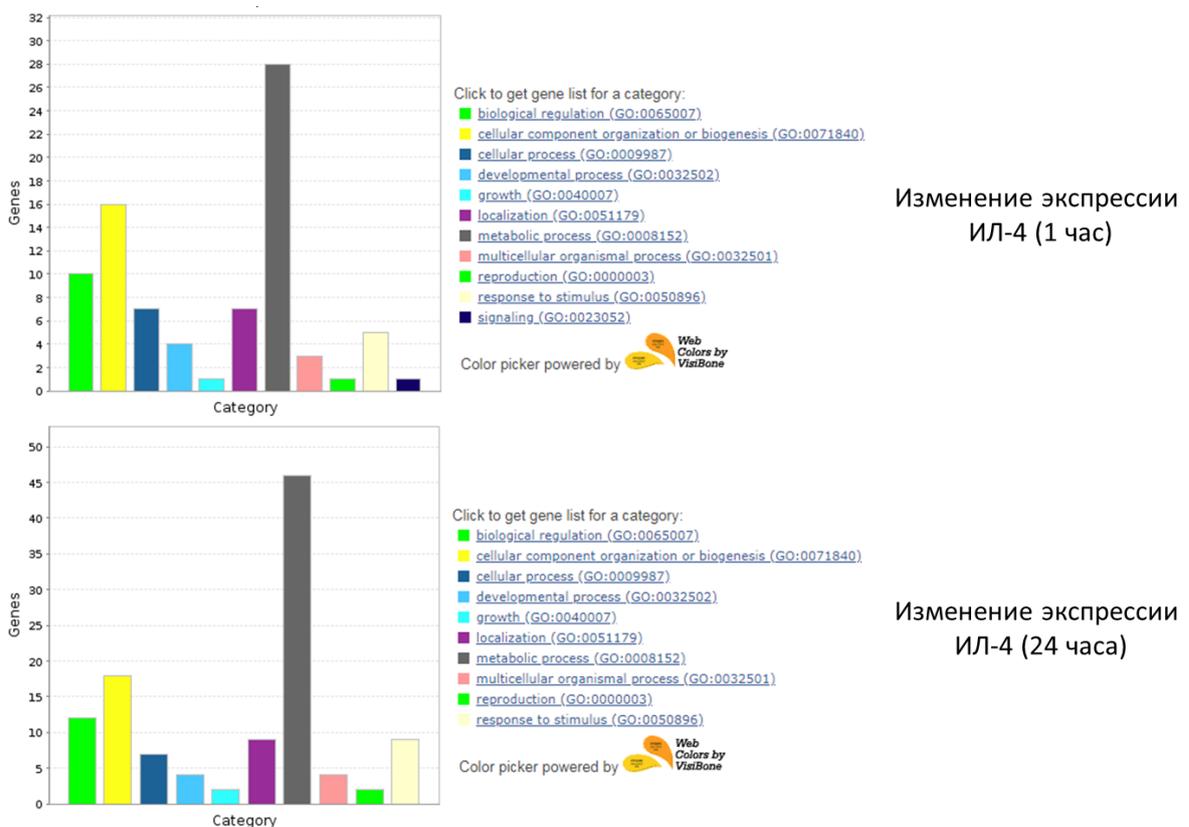


Рис.25. Онтологический анализ генных идентификаторов белков, экспрессия которых условно значимо отличалась от контроля.

Анализ онтологии генов показывает, что среди белков, изменяющих экспрессию в ответ на действие ИЛ-4, наибольшее количество белков сопряжено с регуляцией метаболических процессов. Дальнейший спуск по уровню онтологического анализа данных белков позволяет предполагать, что в адипоцитах под действием ИЛ-4 происходит сдвиг метаболизма в сторону

активной работы митохондрий, что подтверждается данными о статистически значимых различиях в экспрессии белков. Таким образом, действие ИЛ-4 может регулировать не только какие-то определенные сигнальные каскады, но и метаболизм клетки в целом.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

### *4.1. Инсулиновая резистентность и латентное воспаление жировой ткани как следствия нарушения пролиферативного потенциала МСК ЖТ*

В ходе исследования биоптатов жировой ткани пациентов с ожирением и наличием/отсутствием СД2Т мы сформулировали основные вопросы данного исследования: что может управлять развитием ИР с длительным и морбидным ожирением и почему ожирение не всегда сопровождается развитием СД2Т. Мы сравнили биопсии подкожной и сальниковой жировых тканей пациентов с ожирением и наличием/отсутствием СД2Т в отношении морфологии адипоцитов, инфильтрации жировой ткани макрофагами, воспалительного статуса жировой ткани, а также пролиферативной способности МСК ЖТ. В ходе работы мы продемонстрировали, что пациенты с СД2Т имеют больший размер адипоцитов, их МСК ЖТ имеют сниженную пролиферативную способность, сниженную способность к адипоцитарной дифференцировке и повышенную активность воспалительной стресс-активируемой киназы JNK1/2, их жировая ткань сильно инфильтрирована макрофагами, причем иммунофенотип жировой ткани пациентов с СД2Т сдвинут в провоспалительном направлении (Разделы 3.2-3.9). Мы выдвинули гипотезу, что развитие СД2Т может быть обусловлено нарушением пролиферации МСК ЖТ, что приводит к нарушению обновления адипоцитов, росту инфильтрации жировой ткани макрофагами, активацией воспалительного процесса, что способствует формированию инсулиновой резистентности и развитию СД2Т (Рис.26).

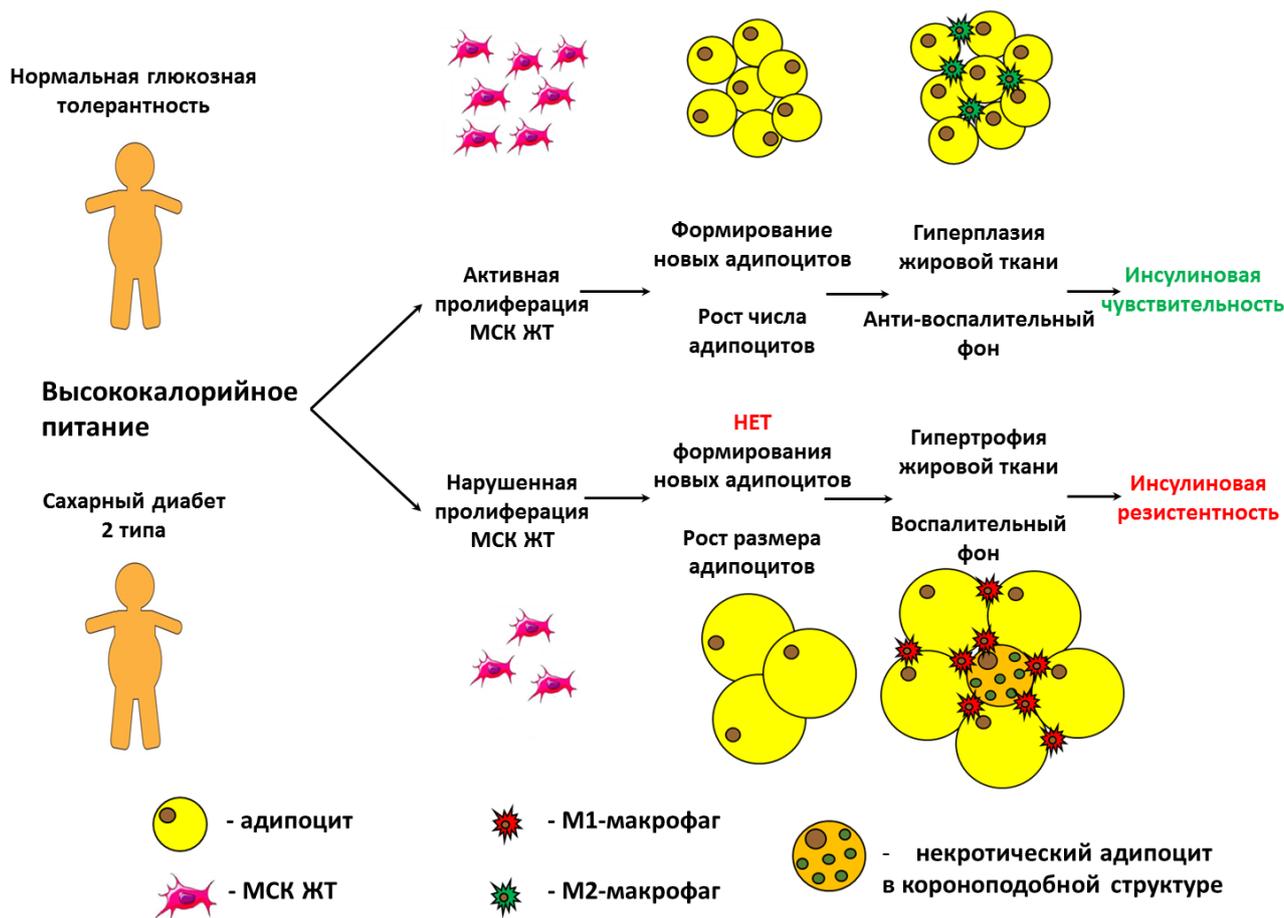


Рис.26. Обобщение гипотезы и результатов, полученных в данной работе. МСК ЖТ – мезенхимальные стромальные клетки жировой ткани.

В ходе работы мы продемонстрировали, что как адипоциты как подкожного, так и сальникового жира обладают гипертрофическим фенотипом. Это могло являться следствием сниженной пролиферативной активности МСК ЖТ пациентов с СД2Т. Поэтому мы проверили эту возможность и продемонстрировали, что FBS практически не стимулирует пролиферацию МСК подкожной жировой ткани пациентов с СД2Т, в то время как обработка FBS МСК подкожной жировой ткани пациентов с НГТ значительно стимулирует пролиферацию МСК. МСК сальниковой жировой ткани проявляли сходную тенденцию, хотя разница между МСК сальниковой жировой ткани была отсрочена и достигала статистической значимости после 72 часов стимуляции. Для обоснования полученных результатов, мы проанализировали распределение клеток по фазам клеточного цикла. После 24 часов стимуляции FBS произошло значительное увеличение числа клеток в G2/S фазе в случае

МСК подкожной жировой ткани пациентов с НГТ, в то время, как стимуляция FBS не изменяла число клеток в G2/S фазе в случае МСК подкожной жировой ткани пациентов с СД2Т. Это может свидетельствовать о том, что различия, наблюдаемые в кривых роста МСК подкожной жировой ткани, обусловлены снижением чувствительности клеток пациентов с СД2Т к факторам роста. Количество МСК сальниковой жировой ткани в G2/S фазе в ответ на стимуляцию FBS существенно не различалось между клетками пациентов с НГТ и с СД2Т, что согласуется с задержкой бифуркации кривых роста клеток. Полученные результаты свидетельствуют о том, что нарушение пролиферации МСК ЖТ может способствовать гипертрофии адипоцитов, а также нарушению формирования новых жировых депо. Гипертрофия адипоцитов является фактором риска развития гипоксии и скрытого воспаления жировой ткани [6, 217, 218], в том числе путем рекрутирования макрофагов и их поляризации в провоспалительный фенотип [27, 103, 104]. Макрофаги представляют собой эффекторные иммунные клетки и их иммунофенотип отражает иммунофенотип регуляторных иммунных клеток, таких как Т-лимфоциты и ВЛК [105, 219-221]. Тем не менее, оценка суммарной инфильтрации макрофагами дает только общую оценку степени воспаления жировой ткани, так как макрофаги способны к поляризации в про- или противовоспалительный фенотип [222-225]. Поэтому в ходе нашей работы мы провели оценку субпопуляционного состава общей популяции жировой ткани.

Используя ССR7 в качестве маркера М1-макрофагов, мы продемонстрировали, что биопсии жировых тканей пациентов с НГТ и с СД2Т статистически достоверно не различались по содержанию М1-подобной популяции макрофагов среди общей популяции макрофагов, которая составила около 55% для подкожной жировой ткани и около 80% для сальниковой жировой ткани. Что касается М2-подобных макрофагов, то почти все макрофаги жировых тканей пациентов с НГТ демонстрировали М2-подобный фенотип (CD68 и CD206 позитивные клетки), в то время как М2-подобная популяция макрофагов

среди общей популяции макрофагов в случае биопсий пациентов с СД2Т составила 85% и 70% для подкожной и сальниковой жировых тканей соответственно. Однако, суммарное число макрофагов, инфильтрировавших жировую ткань, в случае пациентов с СД2Т было в 2 раза выше, по сравнению с пациентами с НГТ, поэтому фракцию провоспалительной M1-популяции макрофагов можно принять за 1.1 и 1.6 в подкожной и сальниковой жировых тканях пациентов с СД2Т ( $2 \cdot 0.55 = 1.1$  для подкожной жировой ткани и  $2 \cdot 0.8 = 1.6$  для сальниковой жировой ткани соответственно) и за 0.55 и 0.8 в подкожной и сальниковой жировых тканях пациентов с НГТ ( $1 \cdot 0.55 = 0.55$  для подкожной жировой ткани и  $1 \cdot 0.8 = 0.8$  для сальниковой жировой ткани соответственно). Аналогичным образом, фракция противовоспалительных M2-макрофагов составит 1.7 и 1.4 в подкожной и сальниковой жировых тканях соответственно пациентов с СД2Т и составляет 1 и 1 в подкожной и сальниковой жировых тканях пациентов с НГТ. Оценим соотношение M1/M2 макрофагов, которое можно принять за показатель иммунофенотипа жировой ткани, составит  $1.1/1.7 = 0.65$  для подкожной жировой ткани пациентов с СД2Т против  $0.55/1 = 0.55$  для подкожной жировой ткани пациентов с НГТ и  $1.6/1.4 = 1.14$  для сальниковой жировой ткани пациентов с СД2Т против  $0.8/1 = 0.8$  для сальниковой жировой ткани пациентов с НГТ. Полученные результаты демонстрируют провоспалительный иммунофенотип жировой ткани пациентов с СД2Т, что подтверждает роль провоспалительного микроокружения в развитии ИР, воспаления жировой ткани и СД2Т [8, 223, 226, 227]. Также полученные результаты подчеркивают важную роль сальниковой жировой ткани в развитии СД2Т, так как именно для сальниковой жировой ткани продемонстрирован более провоспалительный фенотип жировой ткани ( $1.14/0.8 = 1.43$ ), чем у подкожной жировой ткани ( $0.65/0.55 = 1.18$ ). Это подтверждается как клиническими наблюдениями [228-230], так и результатами экспериментальных исследований [231-233].

Провоспалительный сигнальный путь, опосредованный стресс-активируемой

MAP-киназой JNK1/2, регулируется гипоксическими условиями и критически важен в развитии ИР в жировой ткани [234-236]. Мы оценили активацию JNK1/2 по уровню фосфорилирования активирующих сайтов T183/Y185. Активирующее фосфорилирование существенно повышено как в случае адипоцитов, полученных из МСК подкожной жировой ткани пациентов с СД2Т, так и в случае адипоцитов, полученных из МСК сальниковой жировой ткани пациентов с СД2Т, по сравнению с адипоцитами, полученными из МСК ЖТ здоровых доноров. Полученные результаты согласуются с повышенным воспалительным фоном в жировой ткани пациентов с СД2Т и высокой ИР, определенной гиперинсулинемическим эугликемическим клэмп тестом.

Суммируя полученные результаты, можно сказать, что МСК ЖТ пациентов с СД2Т имеют сниженную пролиферативную активность, ассоциированную с гипертрофией зрелых адипоцитов и повышенным воспалительным уровнем как подкожной, так и сальниковой жировых тканей. В контексте развития СД2Т, данные условия не только способствуют развитию ИР, что подтверждено гиперинсулинемическим эугликемическим клэмп тестом, но и нарушают формирование новых жировых депо, что также способствует формированию ИР. Нарушения в адипоцитарной дифференцировке и экспрессии адипоцитарных генов МСК ЖТ продемонстрированы как в нашей работе (Раздел 3.9), так и в литературе [237-240], что может связывать нарушения пролиферативной способности МСК ЖТ с прогрессией СД2Т у людей с ожирением.

#### ***4.2. Моделирование метаболического стресса на зрелых адипоцитах***

##### ***3T3-L1***

Для дальнейшего изучения роли латентного воспаления жировой ткани в формировании ИР нами было проведено исследование 4 моделей метаболического стресса адипоцитов (Раздел 3.10). Было проведено исследование 4 моделей патологических состояний, возникающих в ходе метаболического стресса: гиперлипидемия [210, 241], острое воспаление [242],

гипоксия [7, 213], стресс ЭПР [91, 212]. Согласно полученным результатам, можно заключить, что все исследуемые модели способствуют ухудшению активности инсулиновой сигнализации, а также запускают латентное воспаление. Это сопряжено с запуском классической воспалительной сигнализации в ходе моделирования патологических состояний метаболического стресса, сопровождающих развитие ИР, что ведет к блокирующему серин-треониновому фосфорилированию IRS-1, деградации инсулинового рецептора и IRS [25, 27]. Анализируя полученные результаты по изучению инсулиновой сигнализации под действием всех 4 моделей ИР, можно сказать, что нарушают инсулиновую сигнализацию на ключевых этапах липид-индуцируемая ИР (модель гиперлипидемии), а также ЛПС-индуцируемая ИР (модель острого воспаления). Использование  $Co_2+$  и брефелдина А при моделировании гипоксии и стресса ЭПР не вызывает статистически значимого снижения фосфорилирования pAkt-Ser473. Про данный сайт фосфорилирования Akt известно, что он является мишенью белкового комплекса mTORC2, который инсулин-зависимо способствует фосфорилированию Akt по Ser473 [66, 243]. По видимому,  $Co_2+$  и брефелдин А не оказывают воздействия на mTORC2-зависимую ветвь активации Akt. Анализируя кинетику фосфорилирования стресс-активируемой воспалительной киназы JNK1/2, можно заключить, насколько кинетика развития воспалительного процесса имеет латентный характер. Использование  $Co_2+$  дает быструю активацию воспалительной киназы JNK1/2, что вместе с неполной блокадой инсулинового сигнального каскада делает использование  $Co_2+$  нецелесообразным для моделирования ИР. Использование брефелдина А дает строго латентный характер воспалительного процесса с плавным ростом фосфорилирования JNK1/2, тем не менее за 24 часа обработки активация фосфорилирования JNK1/2 не выходит на плато. Помимо этого блокада инсулинового каскада при использовании брефелдина А также не полная, что делает нецелесообразным использование брефелдина А для моделирования ИР. Бактериальный ЛПС

нарушает инсулиновый сигнальный каскад на всех этапах, но кинетика активации JNK1/2 полностью соответствует кинетике острого воспаления - взрывная активация фосфорилирования на начальных этапах обработки с полным разрешением воспаления к 24 часам инкубации до базального уровня. В связи с этим, бактериальный ЛПС также не является подходящим агентом для индукции ИР и моделирования латентного воспаления. Применение липид-индуцируемой инсулиновой резистентности является оптимальным способом индукции ИР, так как нарушает инсулиновую сигнализацию на всех критических точках: регулятор докинга дальнейших участников инсулинового сигнального каскада IRS-1; киназа, передающая сигнал к эффекторным молекулам; регулятор выхода глюкозного транспортера GLUT4 на клеточную мембрану. Помимо этого, обработка свободными жирными кислотами вызывает активацию JNK1/2 с выходом на плато, которое сохраняется с 8 до 24 часов инкубации. Таким образом, в дальнейшей работе мы использовали липид-индуцируемую модель ИР для выяснения возможностей регуляции воспалительного статуса зрелых адипоцитов для коррекции ИР.

#### ***4.3. Коррекция инсулиновой резистентности с использованием рекомбинантного ИЛ-4***

В данной работе мы продемонстрировали, что использование рекомбинантного ИЛ-4 восстанавливает инсулиновую чувствительность адипоцитов в модели липид-индуцируемой ИР. Оптимальная концентрация ИЛ-4 составила 50 нг/мл, в этой концентрации ИЛ-4 максимально активировал фосфорилирование всех ключевых участников инсулинового каскада и восстанавливал способность адипоцитов к инсулин-индуцируемому захвату глюкозы, при этом не оказывая влияния на адипоцитарную дифференцировку преадипоцитов 3T3-L1. В связи с этим можно предположить, что механизм действия ИЛ-4 не связан с регуляцией адипогенной дифференцировки и формированием новых жировых депо, а имеет сигнальную природу.

Положительное воздействие ИЛ-4 на инсулиновую чувствительность зрелых

адипоцитов стоит связывать с особенностями механизмов развития липид-индуцируемой ИР в адипоцитах. Скорее всего действие свободных жирных кислот связано с активацией Толл-подобных рецепторов 4 типа и запуском воспалительной сигнализации с использованием воспалительных киназ JNK1/2 и IKK [19, 31, 95, 244], которые опосредуют ингибиторное серин-треониновое фосфорилирование IRS-1, нарушая проведение сигнала инсулина и инсулин-индуцируемый захват глюкозы адипоцитами, вызывая хронические метаболические расстройства.

ИЛ-4 представляет собой классический противовоспалительный цитокин. Механизм его действия продемонстрирован в миелоидных клетках и связан с активацией противовоспалительного транскрипционного фактора STAT6 – функционального антагониста основного воспалительного транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B [155]. STAT6 усиливает экспрессию противовоспалительных цитокинов (ИЛ-13, ИЛ-33, TGF $\beta$  и др.), а также подавляет активность провоспалительных транскрипционных факторов и экспрессию провоспалительных цитокинов, противодействуя латентному воспалению в жировой ткани. Это создает предпосылки использования ИЛ-4 в качестве инсулин-сенситизирующего агента в модели липид-индуцированной ИР в адипоцитах. Результаты данной работы дают экспериментальное подтверждение этой гипотезы.

Мы проследили концентрационную зависимость инсулин-сенситизирующего действия ИЛ-4 в модели липид-индуцируемой ИР зрелых адипоцитов. Концентрация ИЛ-4 25 нг/мл была недостаточной для восстановления инсулин-индуцируемого фосфорилирования IRS и Akt. Концентрация 50 нг/мл ИЛ-4 была оптимальной для восстановления активации всех ключевых участников инсулинового сигнального каскада, за исключением pAkt-Ser473, которое достоверно усиливалось по сравнению с показателями в модели ИР, но не восстанавливалось до уровня контроля. Однако необходимо заметить, что для

активации Akt критически необходимо фосфорилирование по остатку Thr308, расположенному в активационной петле фермента, в то время как фосфорилирование Ser473 внутри гидрофобной последовательности фермента носит вспомогательный характер [245]. Фосфорилирование pAkt-Ser473 осуществляется белковым комплексом mTORC2 [66]. Точные механизмы активации mTORC2 в адипоцитах пока изучены недостаточно, однако они включают инсулин-зависимые механизмы. Они могут отвечать за неполный эффект ИЛ-4 на сериновое фосфорилирование Akt, обнаруженный в данной работе.

В концентрации 100 нг/мл ИЛ-4 не оказывал существенно более сильного воздействия на инсулиновую сигнализацию, чем в концентрации 50 нг/мл. В ряде случаев кажущееся снижение способности инсулина стимулировать каскад в присутствии 100 нг/мл по сравнению с 50 нг/мл ИЛ-4 было связано с повышением базальной (инсулин-независимой), но не снижением инсулин-стимулированной активности каскада. Косвенно, это указывает на вероятность неспецифических эффектов высоких концентраций ИЛ-4 и подтверждает оптимальность использования промежуточных концентраций ИЛ-4 порядка 50 нг/мл для восстановления чувствительности к инсулину, по крайней мере, в клеточных моделях.

Помимо этого в ходе данной работы была проанализирована способность адипоцитов к инсулин-индуцируемому захвату глюкозы в модели липид-индуцированной ИР и при действии ИЛ-4. Действие ИЛ-4 незначительно повышает базальный инсулин-индуцируемый захват. Обработка зрелых адипоцитов свободными жирными кислотами ведет к снижению инсулин-индуцируемого захвата глюкозы в 2 раза, а обработка зрелых адипоцитов 50 нг/мл ИЛ-4 в присутствии свободных жирных кислот восстанавливает инсулин-индуцированный захват глюкозы до уровня контроля.

Механизм действия основных антидиабетических препаратов, таких как

метформин и тиазолидиндионы, во многом связан с активацией адипогенной дифференцировки преадипоцитов и формированием новых жировых депо, чувствительных к инсулину [246, 247]. В связи с этим важно, что ИЛ-4 не оказывал влияния на адипогенную дифференцировку преадипоцитов и не стимулировал экспрессию маркеров адипогенеза. Это указывает на иную природу механизма действия ИЛ-4, предположительно за счет активации противовоспалительной сигнализации, и позиционирует использование ИЛ-4 в качестве принципиально иного подхода для восстановления чувствительности к инсулину в жировой ткани.

Резюмируя, мы продемонстрировали высокий потенциал ИЛ-4 для коррекции инсулиновой резистентности жировой ткани. В оптимальных концентрациях ИЛ-4 восстанавливает чувствительность жировых клеток к инсулину в условиях ИР и не влияет на адипогенную дифференцировку и активность инсулинового каскада в нормальных условиях. Тем не менее, дальнейшее использование ИЛ-4 на системном уровне невозможно, так как системное действие ИЛ-4 обладает массой побочных эффектов, связанных с канцерогенезом [248, 249], фиброзом [250, 251] и другими патологиями [252-254]. Поэтому следующим направлением работы в области применения ИЛ-4 для коррекции инсулиновой резистентности жировой ткани является создание генно-терапевтического препарата, направленного специфически на жировую ткань.

#### ***4.4. Коррекция инсулиновой резистентности с использованием лентивируса, кодирующего ген ИЛ-4***

Одной из основных целей в области исследования генно-терапевтического применения ИЛ-4 для коррекции ИР жировой ткани может являться создание препарата, направленный на селективную экспрессию ИЛ-4 в жировой ткани. Анализируя современные генно-инженерные подходы к терапии заболеваний, стоит сказать, что оптимальным решением данной задачи будет создание

адено-ассоциированного вируса 8 или 9 серотипов, имеющих тропность к трансдукции жировой ткани, которые кодируют ген ИЛ-4 под адипоцит-специфическим промотором, а также содержат антисенс-кассеты для блокады неспецифической экспрессии ИЛ-4 в неспецифически трансдуцированных тканях. Тем не менее, первым этапом в реализации этой задачи является тестирование концепции применения ИЛ-4 в генно-терапевтическом варианте для коррекции ИР адипоцитов. Для этой задачи необходимо оценить эффективность использования гена ИЛ-4 в лентивирусном варианте для трансдукции зрелых адипоцитов и последующего моделирования ИР с оценкой инсулиновой чувствительности зрелых адипоцитов. Лентивирусный вариант применения ИЛ-4 для проверки концепции является оптимальным, так как лентивирусы имеют большой титр и обладают хорошей трансдуцирующей способностью.

В нашей работе продемонстрировано, что созданный нами лентивирус высокоэффективно трансдуцирует зрелые адипоциты 3T3-L1, при этом трансдуцированные гены активно экспрессируют мРНК ИЛ-4, а также секретируют ИЛ-4 в концентрации 70 нг/мл. Далее, клетки, экспрессирующие ИЛ-4, обрабатывали свободными жирными кислотами и оценивали инсулиновую чувствительность адипоцитов.

В ходе работы продемонстрировано, что клетки, трансдуцированные геном ИЛ-4, являются невосприимчивыми к развитию ИР, индуцированной свободными жирными кислотами, причем уровень фосфорилирования всех исследованных участников инсулиновой сигнализации статистически не отличается от уровня фосфорилирования исследованных участников инсулиновой сигнализации в контрольных клетках. Трансдукция зрелых адипоцитов геном ИЛ-4 без последующей обработки свободными жирными кислотами ведет к росту фосфорилирования pAkt-Ser473, что может быть связано с особенностями сигнализации ИЛ-4, где принимает участие Akt [153, 255]; в остальном трансдукция ИЛ-4 не изменяет активность инсулиновой сигнализации зрелых

адипоцитов. Анализируя показатели инсулин-индуцируемого захвата глюкозы, стоит сказать, что трансдукция геном ИЛ-4 увеличивает инсулин-стимулируемый захват глюкозы зрелыми адипоцитами в 2 раза по сравнению с контролем, причем как в условиях контроля, так и в условиях обработки свободными жирными кислотами. Таким образом, можно заключить, что адипоциты, трансдуцированные геном ИЛ-4, невосприимчивы к формированию липид-индуцированной ИР.

***4.5. Действие ИЛ-4 на зрелые адипоциты связано с активирующим фосфорилированием и ядерной транслокацией транскрипционного фактора STAT6, а также с транзиторными фосфорилированиями pIRS1-Y612 и pAkt-S473***

Действие ИЛ-4 на зрелые адипоциты в настоящий момент остается дискуссионным вопросом. В 2000 и 2014 годах были опубликованы работы, которые демонстрировали действие ИЛ-4 на преадипоциты 3T3-L1 при полном отсутствии действия ИЛ-4 на зрелые адипоциты 3T3-L1 [171, 172]. Несмотря на это, в 2017-2018 годах вышли 2 работы, которые продемонстрировали действие ИЛ-4 на восстановление инсулиновой чувствительности [173, 174]. Механизм этого действия был более подробно проанализирован в работе Lee и соавторов [173], была впервые в мире показана активация транскрипционного фактора STAT6 с помощью фосфорилирования по сайту Y641 в ответ на действие ИЛ-4 в зрелых адипоцитах, а также продемонстрировано, что нокаут STAT6 снимает действие ИЛ-4 на восстановление инсулиновой чувствительности зрелых адипоцитов. В дальнейшем в работе была показана STAT6-зависимая активация экспрессии цитокинов GDF15 и FGF21, которые обладают антидиабетическим потенциалом и способствуют снижению воспаления и поддержанию гомеостаза жировой ткани [256-260]. Тем не менее, остается открытым вопрос о дальнейшей судьбе STAT6 в зрелых адипоцитах после активирующего фосфорилирования.

В нашей работе продемонстрировано, что действие ИЛ-4 на адипоциты

вызывает активирующее фосфорилирование pSTAT6-Y641, при этом кинетика действия ИЛ-4 затухающая, с максимумом активации фосфорилирования на ранних этапах измерения, что совпадает с результатами наших коллег [173]. Скорость затухания зависит от концентрации ИЛ-4, используемой в эксперименте. Так как при использовании концентрации ИЛ-4 5 нг/мл затухание фосфорилирования STAT6 происходит до уровня контроля, то в эксперименте использовали концентрацию ИЛ-4 50 нг/мл, где затухание фосфорилирование pSTAT6-Y641 происходит не столь активно.

Следующим этапом работы было исследование судьбы STAT6 после действия ИЛ-4 в концентрации 50 нг/мл. Методом конфокальной микроскопии была исследована локализация STAT6 в контрольных клетках, а также при действии ИЛ-4 на временных точках 20 минут и 1 час. Была продемонстрирована цитоплазматическая локализация STAT6 в контрольных клетках. Добавление ИЛ-4 в течение 20 минут вызывает транслокацию STAT6 в ядро, при этом большая часть STAT6 все равно остается в цитоплазме, при добавлении ИЛ-4 в течение 1 часа STAT6 практически полностью исчезает из ядра и локализуется в цитоплазме. Таким образом, можно предположить, что механизм действия ИЛ-4 на зрелые адипоциты связан с кратковременной активацией STAT6, что является триггером, переключающим экспрессию генов и внутриклеточные процессы. Таким образом, в ходе работы впервые продемонстрирована ядерная транслокация STAT6 в ответ на действие ИЛ-4 на зрелые адипоциты, которая усиливается в присутствии свободных жирных кислот.

В ходе работы было показано, что ИЛ-4 активирует транзитное фосфорилирование pIRS1-Y612 и pAkt-S473, не стимулируя при этом фосфорилирование pAkt-T308, а также pAS160-S318 – основного регулятора внутриклеточного трафика GLUT4 (Рис.23). Это позволяет говорить, что ИЛ-4 не активирует сигнальный каскад инсулина, а стимулирует иные активности Akt, не сопряженные с GLUT4. Однако, стоит отметить, что наблюдаемый эффект также является транзитным, как в случае STAT6-зависимой

сигнализации. Возможно, два проанализированных сигнальных каскада являются триггерами, опосредующими иные сигнализации или экспрессию определенных генов, которые способствуют модулированию инсулиновой чувствительности адипоцитов. Протеомный анализ изменения экспрессии белков зрелых адипоцитов 3T3-L1 под действием ИЛ-4 продемонстрировал, что по-видимому действие ИЛ-4 на зрелые адипоциты сопряжено не столько с регуляцией экспрессии про- и противовоспалительных белков, сколько с изменением общего метаболического профиля клетки, о чем свидетельствует изменение экспрессии существенного числа митохондриальных и метаболических белков.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

В настоящее время существуют различные теории развития ИР и СД2Т среди которых гиперлипидемическая гипотеза (применима в основном для мышц, печени и поджелудочной железы), генетическая гипотеза (мутации в областях, кодирующих регуляторные белки и миРНК), окислительная гипотеза (активные окислительные процессы в инсулин-зависимых тканях способствуют нарушению инсулиновой сигнализации) и многие другие. Тем не менее, важнейшее место во всем многообразии механизмов развития СД2Т занимает воспалительная гипотеза. По данным многих экспериментальных исследований убедительно показано, что ожирение и высокожировая диета воспроизводят большинство патогенетических механизмов, встречающихся в отдельных тканях и общим звеном всех реализующихся в жировой ткани механизмов развития ИР является активация воспалительного процесса. В связи с клиническими данными об ассоциации ожирения и развития ИР, можно предположить, что именно жировая ткань является ключевым звеном в развитии системной ИР и СД2Т.

В нашей работе продемонстрирована ключевая роль воспаления в развитии СД2Т. Тип ожирения и воспалительный фон жировой ткани у пациентов с длительным и морбидным ожирением определяет переход ожирения к тяжелой ИР, либо сохранение нормального углеводного метаболизма. В работе продемонстрирована важнейшая роль прогениторных клеток жировой ткани в предрасположенности пациента к развитию СД2Т. Нарушения пролиферативной активности МСК ЖТ способны блокировать формирование новых жировых депо, что ведет к отложению избыточного количества липидов в имеющиеся адипоциты, что способствует их гипертрофии, созданию гипоксических условий в составе жировой ткани. Избыточное поступление липидов и нутриентов ведет к необходимости их переработки, что вызывает активацию стресса ЭПР и оксидативного стресса. Все эти патологические процессы в комплексе способны активировать

воспалительный процесс в жировой ткани, поляризацию иммунных клеток и развитие ИР, что и продемонстрировано в нашей работе.

В терапии СД2Т используется большое количество препаратов, среди которых метформин, сульфонилмочевина, ингибиторы дипептидилпептидазы и многие другие. Тем не менее, несмотря на важную роль воспаления в жировой ткани в развитии ИР и СД2Т, противовоспалительные препараты активно не используются в терапии СД2Т, так как они не обладают существенными преимуществами перед другими антидиабетическими препаратами. Основная стратегия применения противовоспалительных препаратов – блокировать воспаление в составе жировой ткани. Тем не менее, в представленной работе мы предлагаем иную стратегию модуляции воспаления для коррекции ИР – активировать противовоспалительные сигнальные каскады с использованием противовоспалительных цитокинов. В работе продемонстрирован потенциал противовоспалительного цитокина ИЛ-4 для коррекции ИР в жировой ткани, причем применение ИЛ-4 не имеет побочного действия на активацию адипоцитарной дифференцировки, что свойственно для некоторых групп антидиабетических препаратов (тиазолидиндионы). Тем не менее, использование ИЛ-4 в виде рекомбинантного белка невозможно из-за большого числа возможных побочных эффектов. Поэтому, в этой работе продемонстрирован потенциал использования ИЛ-4 в качестве генно-терапевтического препарата для восстановления инсулиновой чувствительности. Lentivirusная трансдукция геном ИЛ-4 зрелых адипоцитов 3T3-L1 предотвращает формирование липид-индуцированной инсулиновой резистентности. В данной работе продемонстрирован механизм действия ИЛ-4 на зрелые адипоциты, который сопряжен с активацией фосфорилирования транскрипционного фактора STAT6 и кратковременной транслокацией STAT6 в ядро. Присутствие свободных жирных кислот в среде культивирования усиливает транслокацию STAT6 в ядро адипоцита, а также транслокация STAT6 в ядро происходит на более длительных временах инкубации.

Таким образом, в данной работе продемонстрирована важнейшая роль воспаления в развитии ИР и СД2Т жировой ткани. По нашей гипотезе, развитие воспаления жировой ткани и ИР сопряжено с нарушением пролиферативного потенциала прогениторных клеток жировой ткани. Показано, что для коррекции ИР возможно использовать противовоспалительный цитокин ИЛ-4 как в виде рекомбинантного белка, так и в виде генно-инженерной конструкции. Механизм действия ИЛ-4 на зрелые адипоциты сопряжен с фосфорилированием транскрипционного фактора STAT6, а также его ядерной транслокацией.

## ВЫВОДЫ

1. Подкожная и сальниковая жировые ткани пациентов с ожирением и СД2Т имеют в своем составе гипертрофированные адипоциты. МСК ЖТ пациентов с ожирением и СД2Т характеризуются сниженными пролиферативным потенциалом и способностью к адипогенной дифференцировке.
2. При ожирении и СД2Т адипоциты, полученные из МСК ЖТ, подкожной и сальниковой жировой ткани имеют повышенную активность стресс-активируемой киназы JNK. Жировая ткань пациентов с ожирением и СД2Т имеет более высокую инфильтрацию макрофагами, склонными к провоспалительному фенотипу.
3. В культуре зрелых адипоцитов 3T3-L1 агенты, индуцирующие метаболический стресс, ухудшают инсулиновую чувствительность. Эти эффекты сопровождаются зависимой от времени активацией стресс-активируемой киназы JNK1/2.
4. Противовоспалительный цитокин ИЛ-4 восстанавливает инсулиновую чувствительность адипоцитов в условиях липид-индуцированной ИР, не влияя на эффективность адипогенной дифференцировки.
5. Зрелые адипоциты 3T3-L1, модифицированные с помощью гена ИЛ-4, защищены от развития липид-индуцируемой ИР.
6. Действие ИЛ-4 на зрелые адипоциты 3T3-L1 сопровождается транзиторной активацией фосфорилирования транскрипционного фактора STAT6 с последующей ядерной транслокацией, а также фосфорилирования pIRS1-Y612 и pAkt-S473.

## БИБЛИОГРАФИЯ

1. Zheng H., Tumin D., Qian Z. Obesity and mortality risk: new findings from body mass index trajectories // *American Journal of Epidemiology*. – 2013. – Т.178, №11. – С.1591-9.
2. Abdelaal M., Le Roux C.W., Docherty N.G. Morbidity and mortality associated with obesity // *Annals of Translational Medicine*. – 2017. – Т.5, №7. – С.161.
3. Cole T.G., Patsch W., Kuisk I., Gonen B., Schonfeld G. Increases in dietary cholesterol and fat raise levels of apoprotein E-containing lipoproteins in the plasma of man // *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. – 1983. – Т.56, №6. – С.1108-15.
4. Golay A., Bobbioni E. The role of dietary fat in obesity // *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders : Journal of the International Association for the Study of Obesity* – 1997. – Т.21, №S3. – С.S2-11.
5. Regazzetti C., Peraldi P., Gremeaux T., et al. Hypoxia decreases insulin signaling pathways in adipocytes // *Diabetes*. – 2009. – Т.58, №1. – С.95-103.
6. Trayhurn P. Hypoxia and adipose tissue function and dysfunction in obesity // *Physiological Reviews*. – 2013. – Т.93, №1. – С.1-21.
7. Trayhurn P. Hypoxia and adipocyte physiology: implications for adipose tissue dysfunction in obesity // *Annual Review of Nutrition*. – 2014. – Т.34. – С.207-36.
8. Hotamisligil G.S. Inflammation and endoplasmic reticulum stress in obesity and diabetes // *International Journal of Obesity*. – 2008. – Т.32, №S7. – С.S52-4.
9. Boden G. Endoplasmic reticulum stress: another link between obesity and insulin resistance/inflammation? // *Diabetes*. – 2009. – Т.58, №3. – С.518-9.
10. Guerrero-Hernandez A., Leon-Aparicio D., Chavez-Reyes J., Olivares-Reyes J.A., DeJesus S. Endoplasmic reticulum stress in insulin resistance and diabetes // *Cell Calcium*. – 2014. – Т.56, №5. – С.311-22.

11. Manna P., Jain S.K. Obesity, Oxidative Stress, Adipose Tissue Dysfunction, and the Associated Health Risks: Causes and Therapeutic Strategies // *Metabolic Syndrome and Related Disorders*. – 2015. – T.13, №10. – C.423-44.
12. Tangvarasittichai S. Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus // *World Journal of Diabetes*. – 2015. – T.6, №3. – C.456-80.
13. Han C.Y. Roles of Reactive Oxygen Species on Insulin Resistance in Adipose Tissue // *Diabetes & Metabolism Journal*. – 2016. – T.40, №4. – C.272-9.
14. Ye J. Emerging role of adipose tissue hypoxia in obesity and insulin resistance // *International Journal of Obesity*. – 2009. – T.33, №1. – C.54-66.
15. Hummasti S., Hotamisligil G.S. Endoplasmic reticulum stress and inflammation in obesity and diabetes // *Circulation Research*. – 2010. – T.107, №5. – C.579-91.
16. Baker R.G., Hayden M.S., Ghosh S. NF-kappaB, inflammation, and metabolic disease // *Cell Metabolism*. – 2011. – T.13, №1. – C.11-22.
17. Hurrle S., Hsu W.H. The etiology of oxidative stress in insulin resistance // *Biomedical Journal*. – 2017. – T.40, №5. – C.257-62.
18. Reilly S.M., Saltiel A.R. Obesity: A complex role for adipose tissue macrophages // *Nature Reviews Endocrinology*. – 2014. – T.10, №4. – C.193-4.
19. Stafeev I.S., Menshikov M.Y., Tsokolaeva Z.I., Shestakova M.V., Parfyonova Y.V. Molecular mechanisms of latent inflammation in metabolic syndrome. Possible role of sirtuins and peroxisome proliferator-activated receptor type gamma // *Biochemistry Biokhimiia*. – 2015. – T.80, №10. – C.1217-26.
20. Gu J.H., Lee J.S., Kim D.W., Yoon E.S., Dhong E.S. Neovascular potential of adipose-derived stromal cells (ASCs) from diabetic patients // *Wound Repair and Regeneration*. – 2012. – T.20, №2. – C.243-52.
21. Dzhoyashvili N.A., Efimenko A.Y., Kochegura T.N., et al. Disturbed angiogenic activity of adipose-derived stromal cells obtained from patients with coronary artery disease and diabetes mellitus type 2 // *Journal of Translational Medicine*. – 2014. – T.12. – C.337.

22. Minter D.M., Young M.T., Lin Y.C., et al. Analysis of type II diabetes mellitus adipose-derived stem cells for tissue engineering applications // *Journal of Tissue Engineering*. – 2015. – Т.6. – Номер статъи 2041731415579215.
23. Kido Y., Nakae J., Accili D. Clinical review 125: The insulin receptor and its cellular targets // *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. – 2001. – Т.86, №3. – С.972-9.
24. Siddle K. Signalling by insulin and IGF receptors: supporting acts and new players // *Journal of Molecular Endocrinology*. – 2011. – Т.47, №1. – С.R1-10.
25. Boucher J., Kleinridders A., Kahn C.R. Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states // *Cold Spring Harbor: Perspectives in Biology*. – 2014. – Т.6, №1.
26. Frayn K.N. Adipose tissue and the insulin resistance syndrome // *The Proceedings of the Nutrition Society*. – 2001. – Т.60, №3. – С.375-80.
27. Stafeev I.S., Vorotnikov A.V., Ratner E.I., Menshikov M.Y., Parfyonova Y.V. Latent inflammation and insulin resistance in adipose tissue // *International Journal of Endocrinology*. – 2017. – Т.2017. – Номер статъи 5076732.
28. Zick Y. Uncoupling insulin signalling by serine/threonine phosphorylation: a molecular basis for insulin resistance // *Biochemical Society Transactions*. – 2004. – Т.32. – С.812-6.
29. Boura-Halfon S., Zick Y. Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance // *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism*. – 2009. – Т.296, №4. – С.E581-91.
30. Boura-Halfon S., Zick Y. Serine kinases of insulin receptor substrate proteins // *Vitamins and Hormones*. – 2009. – Т.80. – С.313-49.
31. Hirosumi J., Tuncman G., Chang L., et al. A central role for JNK in obesity and insulin resistance // *Nature*. – 2002. – Т.420. – С.333-6.
32. Arkan M.C., Hevener A.L., Greten F.R., et al. IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance // *Nature Medicine*. – 2005. – Т.11, №2. – С.191-8.

33. Donath M.Y. Targeting inflammation in the treatment of type 2 diabetes // *Diabetes, Obesity & Metabolism*. – 2013. – T.15, №3. – C.193-6.
34. Ofei F., Hurel S., Newkirk J., Sopwith M., Taylor R. Effects of an engineered human anti-TNF-alpha antibody (CDP571) on insulin sensitivity and glycemic control in patients with NIDDM // *Diabetes*. – 1996. – T.45, №7. – C.881-5.
35. Yuan M., Konstantopoulos N., Lee J., et al. Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta // *Science*. – 2001. – T.293. – C.1673-7.
36. Dominguez H., Storgaard H., Rask-Madsen C., et al. Metabolic and vascular effects of tumor necrosis factor-alpha blockade with etanercept in obese patients with type 2 diabetes // *Journal of Vascular Research*. – 2005. – T.42, №6. – C.517-25.
37. Qiu Y., Nguyen K.D., Odegaard J.I., et al. Eosinophils and type 2 cytokine signaling in macrophages orchestrate development of functional beige fat // *Cell*. – 2014. – T.157, №6. – C.1292-308.
38. Lee M.W., Odegaard J.I., Mukundan L., et al. Activated type 2 innate lymphoid cells regulate beige fat biogenesis // *Cell*. – 2015. – T.160, №1-2. – C.74-87.
39. WHO Report. World Health Statistics 2015, 2015.
40. Levine R., Goldstein M.S., Huddlestun B., Klein S.P.. Action of insulin on the 'permeability' of cells to free hexoses, as studied by its effect on the distribution of galactose // *The American Journal of Physiology*. – 1950. – T.163, №1. – C.70-6.
41. Wilcox G. Insulin and insulin resistance // *The Clinical Biochemist Reviews*. – 2005. – T.26, №2. – C.19-39.
42. Zelzer E., Levy Y., Kahana C., Shilo B.Z., Rubinstein M., Cohen B. Insulin induces transcription of target genes through the hypoxia-inducible factor HIF-1alpha/ARNT // *The EMBO Journal*. – 1998. – T.17, №17. – C.5085-94.
43. Samuel V.T., Petersen K.F., Shulman G.I. Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism // *Lancet*. – 2010. – T.375, №9733. – C.2267-77.

44. Kumashiro N., Erion D.M., Zhang D., et al. Cellular mechanism of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2011. – T.108, №39. – C.16381-5.
45. Choi S.M., Tucker D.F., Gross D.N., et al. Insulin regulates adipocyte lipolysis via an Akt-independent signaling pathway // *Molecular and Cellular Biology*. – 2010. – T.30, №21. – C.5009-20.
46. Saltiel A.R., Kahn C.R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism // *Nature*. – 2001. – T.414, №6865. – C.799-806.
47. Bluher M., Michael M.D., Peroni O.D., et al. Adipose tissue selective insulin receptor knockout protects against obesity and obesity-related glucose intolerance // *Developmental Cell*. – 2002. – T.3, №1. – C.25-38.
48. Sakaguchi M., Fujisaka S., Cai W., et al. Adipocyte dynamics and reversible metabolic syndrome in mice with an inducible adipocyte-specific deletion of the insulin receptor // *Cell Metabolism*. – 2017. – Vol.25, №2. – C.448-62.
49. Boucher J., Softic S., El Ouaamari A., et al. Differential roles of insulin and IGF-1 receptors in adipose tissue development and function // *Diabetes*. – 2016. – T.65, №8. – C.2201-13.
50. Shaw L.M. The insulin receptor substrate (IRS) proteins: at the intersection of metabolism and cancer // *Cell Cycle*. – 2011. – T.10, №11. – C.1750-6.
51. Sun X.J., Crimmins D.L., Myers M.G. Jr., Miralpeix M., White M.F. Pleiotropic insulin signals are engaged by multisite phosphorylation of IRS-1 // *Molecular and Cellular Biology*. – 1993. – T.13, №12. – C.7418-28.
52. Araki E., Lipes M.A., Patti M.E., et al. Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene // *Nature*. – 1994. – T.372, №6502. – C.186-90.
53. Withers D.J., Gutierrez J.S., Towery H., et al. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice // *Nature*. – 1998. – T.391, №6670. – C.900-4.

54. Sciacchitano S., Taylor S.I. Cloning, tissue expression, and chromosomal localization of the mouse IRS-3 gene // *Endocrinology*. – 1997. – T.138, №11. – C.4931-40.
55. Bjornholm M., He A.R., Attersand A., et al. Absence of functional insulin receptor substrate-3 (IRS-3) gene in humans // *Diabetologia*. – 2002. – T.45, №12. – C.1697-702.
56. Fantin V.R., Lavan B.E., Wang Q., et al. Cloning, tissue expression, and chromosomal location of the mouse insulin receptor substrate 4 gene // *Endocrinology*. – 1999. – T.140, №3. – C.1329-37.
57. Fantin V.R., Wang Q., Lienhard G.E., Keller S.R. Mice lacking insulin receptor substrate 4 exhibit mild defects in growth, reproduction, and glucose homeostasis // *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism*. – 2000. – T.278, №1. – C.E127-33.
58. Cai D., Dhe-Paganon S., Melendez P.A., Lee J., Shoelson S.E. Two new substrates in insulin signaling, IRS5/DOK4 and IRS6/DOK5 // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2003. – T.278, №28. – C.25323-30.
59. Birge R.B., Kalodimos C., Inagaki F., Tanaka S. Crk and CrkL adaptor proteins: networks for physiological and pathological signaling // *Cell Communication and Signaling*. – 2009. – T.7. – C.13.
60. Hawkins P.T., Anderson K.E., Davidson K., Stephens L.R. Signalling through Class I PI3Ks in mammalian cells // *Biochemical Society Transactions*. – 2006. – T.34, №5. – C.647-62.
61. Pearce L.R., Komander D., Alessi D.R. The nuts and bolts of AGC protein kinases // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2010. – T.11, №1. – C.9-22.
62. Alessi D.R., James S.R., Downes C.P., et al. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha // *Current Biology*. – 1997. – T.7, №4. – C.261-9.

63. Mora A., Komander D., Van Aalten D.M., Alessi D.R. PDK1, the master regulator of AGC kinase signal transduction // *Seminars in Cell & Developmental Biology*. – 2004. – T.15, №2. – C.161-70.
64. Frodin M., Antal T.L., Dummler B.A., et al. A phosphoserine/threonine-binding pocket in AGC kinases and PDK1 mediates activation by hydrophobic motif phosphorylation // *The EMBO Journal*. – 2002. – T.21, №20. – C.5396-407.
65. Bhaskar P.T., Hay N. The two TORCs and Akt // *Developmental Cell*. – 2007. – T.12, №4. – C.487-502.
66. Sarbassov D.D., Guertin D.A., Ali S.M., Sabatini D.M. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex // *Science*. – 2005. – T.307, №5712. – C.1098-101.
67. Toker A. Akt signaling: a damaging interaction makes good // *Trends in Biochemical Sciences*. – 2008. – T.33, №8. – C.356-9.
68. Cross D.A., Alessi D.R., Vandenheede J.R., McDowell H.E., Hundal H.S., Cohen P. The inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin or insulin-like growth factor 1 in the rat skeletal muscle cell line L6 is blocked by wortmannin, but not by rapamycin: evidence that wortmannin blocks activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in L6 cells between Ras and Raf // *The Biochemical Journal*. – 1994. – T.303, №1. – C.21-6.
69. Nakae J., Kitamura T., Kitamura Y., Biggs W.H., Arden K.C., Accili D. The forkhead transcription factor Foxo1 regulates adipocyte differentiation // *Developmental Cell*. – 2003. – T.4, №1. – C.119-29.
70. Lowe C.E., O'Rahilly S., Rochford J.J. Adipogenesis at a glance // *Journal of Cell Science*. – 2011. – T.124, №16. – C.2681-6.
71. Bai D., Ueno L., Vogt P.K. Akt-mediated regulation of NFkappaB and the essentialness of NFkappaB for the oncogenicity of PI3K and Akt // *International Journal of Cancer*. – 2009. – T.125, №12. – C.2863-70.

72. Goldstein B.J., Ahmad F., Ding W., Li P.M., Zhang W.R. Regulation of the insulin signalling pathway by cellular protein-tyrosine phosphatases // *Molecular and Cellular Biochemistry*. – 1998. – T.182, №1-2. – C.91-9.
73. Brady M.J., Saltiel A.R. The role of protein phosphatase-1 in insulin action // *Recent Progress in Hormone Research*. – 2001. – T.56. – C.157-73.
74. Kowluru A., Matti A. Hyperactivation of protein phosphatase 2A in models of glucolipototoxicity and diabetes: potential mechanisms and functional consequences // *Biochemical Pharmacology*. – 2012. – T.84, №5. – C.591-7.
75. Chagpar R.B., Links P.H., Pastor M.C., et al. Direct positive regulation of PTEN by the p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2010. – T.107, №12. – C.5471-6.
76. Sleeman M.W., Wortley K.E., Lai K.M., et al. Absence of the lipid phosphatase SHIP2 confers resistance to dietary obesity // *Nature Medicine*. – 2005. – T.11, №2. – C.199-205.
77. Kagawa S., Soeda Y., Ishihara H., et al. Impact of transgenic overexpression of SH2-containing inositol 5'-phosphatase 2 on glucose metabolism and insulin signaling in mice // *Endocrinology*. – 2008. – T.149, №2. – C.642-50.
78. Demidova T.U., Erokhina E.N. Effect of thiazolidinediones on insulin resistance and cardiovascular risk factors in type 2 diabetes // *Obesity and Metabolism (Russian)*. – 2008. – T.5, №2. – C.2-5.
79. Saltiel A.R. New therapeutic approaches for the treatment of obesity // *Science Translational Medicine*. – 2016. – T.8, №323. –C.323rv2.
80. Suganami T., Ogawa Y. Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling // *Journal of Leukocyte Biology*. – 2010. – T.88, №1. – C.33-9.
81. Achike F.I., To N.H., Wang H., Kwan C.Y. Obesity, metabolic syndrome, adipocytes and vascular function: A holistic viewpoint // *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*. – 2011. – T.38, №1. – C.1-10.

82. Taleb S., Canello R., Clement K., Lacasa D. Cathepsin S promotes human preadipocyte differentiation: possible involvement of fibronectin degradation // *Endocrinology*. – 2006. – T.147, №10. – C.4950-9.
83. Trayhurn P., Wood I.S. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue // *The British Journal of Nutrition*. – 2004. – T.92, №3. – C.347-55.
84. Wood I.S., De Heredia F.P., Wang B., Trayhurn P. Cellular hypoxia and adipose tissue dysfunction in obesity // *The Proceedings of the Nutrition Society*. – 2009. – T.68, №4. – C.370-7.
85. Weidemann A., Johnson R.S. Biology of HIF-1alpha // *Cell Death and Differentiation*. – 2008. – T.15, №4. – C.621-7.
86. Greer S.N., Metcalf J.L., Wang Y., Ohh M. The updated biology of hypoxia-inducible factor // *The EMBO Journal*. – 2012. – T.31, №11. – C.2448-60.
87. Ye J., Gao Z., Yin J., He Q. Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of ob/ob and dietary obese mice // *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism*. – 2007. – T.293, №4. – C.E1118-28.
88. Melillo G. Hypoxia: jump-starting inflammation // *Blood*. – 2011. – T.117, №9. – C.2561-2.
89. Bartels K., Grenz A., Eltzschig H.K. Hypoxia and inflammation are two sides of the same coin // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2013. – T.110, №46. – C.18351-2.
90. Eltzschig H.K., Carmeliet P. Hypoxia and inflammation // *The New England Journal of Medicine*. – 2011. – T.364, №7. – C.656-65.
91. Ozcan L., Tabas I. Role of endoplasmic reticulum stress in metabolic disease and other disorders // *Annual Review of Medicine*. – 2012. – T.63. – C.317-28.
92. Yoneda T., Imaizumi K., Oono K., et al. Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-

associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2001. – T.276, №17. – C.13935-40.

93. Matsuda M., Shimomura I. Increased oxidative stress in obesity: implications for metabolic syndrome, diabetes, hypertension, dyslipidemia, atherosclerosis, and cancer // *Obesity Research & Clinical Practice*. – 2013. – T.7, №5. – C.e330-41.

94. Fernandez-Sanchez A., Madrigal-Santillan E., Bautista M., et al. Inflammation, oxidative stress, and obesity // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2011. – T.12, №5. – C.3117-32.

95. Sartipy P., Loskutoff D.J. Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2003. – T.100, №12. – C.7265-70.

96. Vicente-Manzanares M., Sanchez-Madrid F. Cell polarization: a comparative cell biology and immunological view // *Developmental Immunology*. – 2000. – T.7, №2-4. – C.51-65.

97. Kourilsky P., Truffa-Bachi P. Cytokine fields and the polarization of the immune response // *Trends in Immunology*. – 2001. – T.22, №9. – C.502-9.

98. Rodriguez M., Domingo E., Municio C., et al. Polarization of the innate immune response by prostaglandin E2: a puzzle of receptors and signals // *Molecular Pharmacology*. – 2014. – T.85, №1. – C.187-97.

99. Hazenberg M.D., Spits H. Human innate lymphoid cells // *Blood*. – 2014. – T.124, №5. – C.700-9.

100. Bando J.K., Colonna M. Innate lymphoid cell function in the context of adaptive immunity // *Nature Immunology*. – 2016. – T.17, №7. – C.783-9.

101. Mjosberg J., Bernink J., Peters C., Spits H. Transcriptional control of innate lymphoid cells // *European Journal of Immunology*. – 2012. – T.42, №8. – C.1916-23.

102. Chalubinski M., Luczak E., Wojdan K., Gorzelak-Pabis P., Broncel M. Innate lymphoid cells type 2 - emerging immune regulators of obesity and atherosclerosis // *Immunology Letters*. – 2016. – T.179. – C.43-6.

103. Saetang J., Sangkhathat S. Role of innate lymphoid cells in obesity and metabolic disease // *Molecular Medicine Reports*. – 2018. – T.17, №1. – C.1403-12.
104. Boulouvar S., Michelet X., Duquette D., et al. Adipose type one innate lymphoid cells regulate macrophage homeostasis through targeted cytotoxicity // *Immunity*. – 2017. – T.46, №2. – C.273-86.
105. O'Sullivan T.E., Rapp M., Fan X., et al. Adipose-resident group 1 innate lymphoid cells promote obesity-associated insulin resistance // *Immunity*. – 2016. – T.45, №2. – C.428-41.
106. Cretney E., Kallies A., Nutt S.L. Differentiation and function of Foxp3(+) effector regulatory T cells // *Trends in Immunology*. – 2013. – T.34, №2. – C.74-80.
107. Eller K., Kirsch A., Wolf A.M., et al. Potential role of regulatory T cells in reversing obesity-linked insulin resistance and diabetic nephropathy // *Diabetes*. – 2011. – T.60, №11. – C.2954-62.
108. Priceman S.J., Kujawski M., Shen S., et al. Regulation of adipose tissue T cell subsets by Stat3 is crucial for diet-induced obesity and insulin resistance // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2013. – T.110, №32. – C.13079-84.
109. Bertola A., Ciucci T., Rousseau D., et al. Identification of adipose tissue dendritic cells correlated with obesity-associated insulin-resistance and inducing Th17 responses in mice and patients // *Diabetes*. – 2012. – T.61, №9. – C.2238-47.
110. Ip B., Cilfone N.A., Belkina A.C., et al. Th17 cytokines differentiate obesity from obesity-associated type 2 diabetes and promote TNFalpha production // *Obesity (Silver Spring, Md)*. – 2016. – T.24, №1. – C.102-12.
111. Jung C., Lichtenauer M., Strodthoff D., et al. Alterations in systemic levels of Th1, Th2, and Th17 cytokines in overweight adolescents and obese mice // *Pediatric Diabetes*. – 2017. – T.18, №8. – C.714-21.
112. Mraz M., Haluzik M. The role of adipose tissue immune cells in obesity and low-grade inflammation // *The Journal of Endocrinology*. – 2014. – T.222, №3. – C.R113-27.

113. LeBien T.W., Tedder T.F. B lymphocytes: how they develop and function // *Blood*. – 2008. – T.112, №5. – C.1570-80.
114. DeFuria J., Belkina A.C., Jagannathan-Bogdan M., et al. B cells promote inflammation in obesity and type 2 diabetes through regulation of T-cell function and an inflammatory cytokine profile // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2013. – T.110, №13. – C.5133-8.
115. Duffaut C., Galitzky J., Lafontan M., Bouloumie A. Unexpected trafficking of immune cells within the adipose tissue during the onset of obesity // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2009. – T.384, №4. – C.482-5.
116. Ying W., Wollam J., Ofrecio J.M., et al. Adipose tissue B2 cells promote insulin resistance through leukotriene LTB<sub>4</sub>/LTB<sub>4</sub>R1 signaling // *The Journal of Clinical Investigation*. – 2017. – T.127, №3. – C.1019-30.
117. Hashimoto I., Wada J., Hida A., et al. Elevated serum monocyte chemoattractant protein-4 and chronic inflammation in overweight subjects // *Obesity (Silver Spring, Md)*. – 2006. – T.14, №5. – C.799-811.
118. Dominguez P.M., Ardavin C. Differentiation and function of mouse monocyte-derived dendritic cells in steady state and inflammation // *Immunological Reviews*. – 2010. – T.234, №1. – C.90-104.
119. Stefanovic-Racic M., Yang X., Turner M.S., et al. Dendritic cells promote macrophage infiltration and comprise a substantial proportion of obesity-associated increases in CD11c<sup>+</sup> cells in adipose tissue and liver // *Diabetes*. – 2012. – T.61, №9. – C.2330-9.
120. Ji Y., Sun S., Xu A., et al. Activation of natural killer T cells promotes M2 Macrophage polarization in adipose tissue and improves systemic glucose tolerance via interleukin-4 (IL-4)/STAT6 protein signaling axis in obesity // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2012. – T.287, №17. – C.13561-71.
121. Lee B.C., Kim M.S., Pae M., et al. Adipose natural killer cells regulate adipose tissue macrophages to promote insulin resistance in obesity // *Cell Metabolism*. – 2016. – T.23, №4. – C.685-98.

122. Edwards J.P., Zhang X., Frauwirth K.A., Mosser D.M. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations // *Journal of Leukocyte Biology*. – 2006. – T.80, №6. – C.1298-307.
123. Sica A., Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas // *The Journal of Clinical Investigation*. – 2012. – T.122, №3. – C.787-95.
124. Horwitz E.M., Le Blanc K., Dominici M., et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement // *Cytotherapy*. – 2005. – T.7, №5. – C.393-5.
125. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement // *Cytotherapy*. – 2006. – T.8, №4. – C.315-7.
126. Bunnell B.A., Flaat M., Gagliardi C., Patel B., Ripoll C. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation // *Methods (San Diego)*. – 2008. – T.45, №2. – C.115-20.
127. Cawthorn W.P., Scheller E.L., MacDougald O.A. Adipose tissue stem cells meet preadipocyte commitment: going back to the future // *Journal of Lipid Research*. – 2012. – T.53, №2. – C.227-46.
128. Jo J., Gavrilova O., Pack S., et al. Hypertrophy and/or hyperplasia: dynamics of adipose tissue growth // *PLoS Computational Biology*. – 2009. – T.5, №3. – C.e1000324.
129. Muir L.A., Neeley C.K., Meyer K.A., et al. Adipose tissue fibrosis, hypertrophy, and hyperplasia: Correlations with diabetes in human obesity // *Obesity (Silver Spring, Md)*. – 2016. – T.24, №3. – C.597-605.
130. Eckel R.H., Kahn S.E., Ferrannini E., et al. Obesity and type 2 diabetes: what can be unified and what needs to be individualized? // *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. – 2011. – T.96, №6. – C.1654-63.
131. McIntosh K., Zvonic S., Garrett S., et al. The immunogenicity of human adipose-derived cells: temporal changes in vitro // *Stem cells (Dayton, Ohio)*. – 2006. – T.24, №5. – C.1246-53.

132. Melief S.M., Zwaginga J.J., Fibbe W.E., Roelofs H. Adipose tissue-derived multipotent stromal cells have a higher immunomodulatory capacity than their bone marrow-derived counterparts // *Stem Cells Translational Medicine*. – 2013. – T.2, №6. – C.455-63.
133. Russo V., Yu C., Belliveau P., Hamilton A., Flynn L.E. Comparison of human adipose-derived stem cells isolated from subcutaneous, omental, and intrathoracic adipose tissue depots for regenerative applications // *Stem Cells Translational Medicine*. – 2014. – T.3, №2. – C.206-17.
134. Cao M., Pan Q., Dong H., et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells improve glucose homeostasis in high-fat diet-induced obese mice // *Stem Cell Research & Therapy*. – 2015. – T.6. –C.208.
135. Shang Q., Bai Y., Wang G., et al. Delivery of adipose-derived stem cells attenuates adipose tissue inflammation and insulin resistance in obese mice through remodeling macrophage phenotypes // *Stem Cells and Development*. – 2015. – T.24, №17. – C.2052-64.
136. Liao N., Zheng Y., Xie H., et al. Adipose tissue-derived stem cells ameliorate hyperglycemia, insulin resistance and liver fibrosis in the type 2 diabetic rats // *Stem Cell Research & Therapy*. – 2017. – T.8, №1. – C.286.
137. Zhao H., Shang Q., Pan Z., et al. Exosomes from adipose-derived stem cells attenuate adipose inflammation and obesity through polarizing M2 macrophages and beiging in white adipose tissue // *Diabetes*. – 2018. – T.67, №2. – C.235-47.
138. Eljaafari A., Robert M., Chehimi M., et al. Adipose tissue-derived stem cells from obese subjects contribute to inflammation and reduced insulin response in adipocytes through differential regulation of the Th1/Th17 balance and monocyte activation // *Diabetes*. – 2015. – T.64, №7. – C.2477-88.
139. Pincu Y., Huntsman H.D., Zou K., et al. Diet-induced obesity regulates adipose-resident stromal cell quantity and extracellular matrix gene expression // *Stem Cell Research*. – 2016. – T.17, №1. – C.181-90.

140. Conley S.M., Zhu X.Y., Eirin A., et al. Metabolic syndrome alters expression of insulin signaling-related genes in swine mesenchymal stem cells // *Gene*. – 2018. – T.644. – C.101-6.
141. Hotamisligil G.S., Shargill N.S., Spiegelman B.M.. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance // *Science (New York, NY)*. – 1993. – T.259, №5091. – C.87-91.
142. Stanley T.L., Zanni M.V., Johnsen S., et al. TNF-alpha antagonism with etanercept decreases glucose and increases the proportion of high molecular weight adiponectin in obese subjects with features of the metabolic syndrome // *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. – 2011. – T.96, №1. – C.E146-50.
143. Faghihimani E., Aminorroaya A., Rezvanian H., Adibi P., Ismail-Beigi F., Amini M. Salsalate improves glycemic control in patients with newly diagnosed type 2 diabetes // *Acta Diabetologica*. – 2013. – T.50, №4. – C.537-43.
144. Goldfine A.B., Conlin P.R., Halperin F., et al. A randomised trial of salsalate for insulin resistance and cardiovascular risk factors in persons with abnormal glucose tolerance // *Diabetologia*. – 2013. – T.56, №4. – C.714-23.
145. Goldfine A.B., Fonseca V., Jablonski K.A., et al. Salicylate (salsalate) in patients with type 2 diabetes: a randomized trial // *Annals of Internal Medicine*. – 2013. – T.159, №1. – C.1-12.
146. Larsen C.M., Faulenbach M., Vaag A., et al. Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus // *The New England Journal of Medicine*. – 2007. – T.356, №15. – C.1517-26.
147. Larsen C.M., Faulenbach M., Vaag A., Ehses J.A., Donath M.Y., Mandrup-Poulsen T. Sustained effects of interleukin-1 receptor antagonist treatment in type 2 diabetes // *Diabetes Care*. – 2009. – T.32, №9. – C.1663-8.
148. Hensen J., Howard C.P., Walter V., Thuren T. Impact of interleukin-1beta antibody (canakinumab) on glycaemic indicators in patients with type 2 diabetes mellitus: results of secondary endpoints from a randomized, placebo-controlled trial // *Diabetes & Metabolism*. – 2013. – T.39, №6. – C.524-31.

149. Weisberg S.P., Hunter D., Huber R., et al. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding // *The Journal of Clinical Investigation*. – 2006. – T.116, №1. – C.115-24.
150. Haigis M.C., Sinclair D.A. Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance // *Annual Review of Pathology*. – 2010. – T.5. – C.253-95.
151. Imai Y., Dobrian A.D., Weaver J.R., et al. Interaction between cytokines and inflammatory cells in islet dysfunction, insulin resistance and vascular disease // *Diabetes, Obesity & Metabolism*. – 2013. – T.15, №S3. – C.117-29.
152. Nelms K., Keegan A.D., Zamorano J., Ryan J.J., Paul W.E. The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions // *Annual Review of Immunology*. – 1999. – T.17. – C.701-38.
153. Kelly-Welch A.E., Hanson E.M., Boothby M.R., Keegan A.D. Interleukin-4 and interleukin-13 signaling connections maps // *Science (New York, NY)*. – 2003. – T.300, №5625. – C.1527-8.
154. LaPorte S.L., Juo Z.S., Vaclavikova J., et al. Molecular and structural basis of cytokine receptor pleiotropy in the interleukin-4/13 system // *Cell*. – 2008. – T.132, №2. – C.259-72.
155. Luzina I.G., Keegan A.D., Heller N.M., Rook G.A., Shea-Donohue T., Atamas S.P. Regulation of inflammation by interleukin-4: a review of "alternatives" // *Journal of Leukocyte Biology*. – 2012. – T.92, №4. – C.753-64.
156. Lee H.M., Jin H.S., Park J.W., Park S.M., Jeon H.K., Lee T.H. IL-4 augments anisomycin-induced p38 activation via Akt pathway in a follicular dendritic cell (FDC)-like line // *FEBS Letters*. – 2003. – T.549, №1-3. – C.110-4.
157. Heller N.M., Qi X., Junttila I.S., et al. Type I IL-4Rs selectively activate IRS-2 to induce target gene expression in macrophages // *Science Signaling*. – 2008. – T.1, №51. – C.ra17.
158. Mikita T., Campbell D., Wu P., Williamson K., Schindler U. Requirements for interleukin-4-induced gene expression and functional characterization of Stat6 // *Molecular and Cellular Biology*. – 1996. – T.16, №10. – C.5811-20.

159. Schindler U., Wu P., Rothe M., Brasseur M., McKnight S.L. Components of a Stat recognition code: evidence for two layers of molecular selectivity // *Immunity*. – 1995. – T.2, №6. – C.689-97.
160. Chen W., Daines M.O., Hershey G.K. Methylation of STAT6 modulates STAT6 phosphorylation, nuclear translocation, and DNA-binding activity // *Journal of Immunology*. – 2004. – T.172, №11. – C.6744-50.
161. Wang Y., Malabarba M.G., Nagy Z.S., Kirken R.A. Interleukin 4 regulates phosphorylation of serine 756 in the transactivation domain of Stat6. Roles for multiple phosphorylation sites and Stat6 function // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – T.279, №24. – C.25196-203.
162. Shirakawa T., Kawazoe Y., Tsujikawa T., Jung D., Sato S., Uesugi M. Deactivation of STAT6 through serine 707 phosphorylation by JNK // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2011. – T.286, №5. – C.4003-10.
163. Brown M.A. IL-4 production by T cells: you need a little to get a lot // *Journal of Immunology*. – 2008. – T.181, №5. – C.2941-2.
164. Yang W.C., Hwang Y.S., Chen Y.Y., et al. Interleukin-4 supports the suppressive immune responses elicited by regulatory T cells // *Frontiers in Immunology*. – 2017. – T.8. – C.1508.
165. Chomarat P., Banchereau J. An update on interleukin-4 and its receptor // *European Cytokine Network*. – 1997. – T.8, №4. – C.333-44.
166. Abdel-Razzak Z., Loyer P., Fautrel A., et al. Cytokines down-regulate expression of major cytochrome P-450 enzymes in adult human hepatocytes in primary culture // *Molecular Pharmacology*. – 1993. – T.44, №4. – C.707-15.
167. Ricardo-Gonzalez R.R., Red Eagle A., Odegaard J.I., et al. IL-4/STAT6 immune axis regulates peripheral nutrient metabolism and insulin sensitivity // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2010. – T.107, №52. – C.22617-22.

168. Chang Y.H., Ho K.T., Lu S.H., Huang C.N., Shiau M.Y. Regulation of glucose/lipid metabolism and insulin sensitivity by interleukin-4 // *International Journal of Obesity*. – 2012. – T.36, №7. – C.993-8.
169. Darkhal P., Gao M., Ma Y., Liu D. Blocking high-fat diet-induced obesity, insulin resistance and fatty liver by overexpression of IL-13 gene in mice // *International Journal of Obesity*. – 2015. – T.39, №8. – C.1292-9.
170. Odegaard J.I., Chawla A. Type 2 responses at the interface between immunity and fat metabolism // *Current Opinion in Immunology*. – 2015. – T.36. – C.67-72.
171. Deng J., Hua K., Lesser S.S., et al. Interleukin-4 mediates STAT6 activation in 3T3-L1 preadipocytes but not adipocytes // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2000. – T.267, №2. – C.516-20.
172. Tsao C.H., Shiau M.Y., Chuang P.H., Chang Y.H., Hwang J. Interleukin-4 regulates lipid metabolism by inhibiting adipogenesis and promoting lipolysis // *Journal of Lipid Research*. – 2014. – T.55, №3. – C.385-97.
173. Lee S.E., Kang S.G., Choi M.J., et al. Growth differentiation factor 15 mediates systemic glucose regulatory action of T-helper type 2 cytokines // *Diabetes*. – 2017. – T.66, №11. – C.2774-88.
174. 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 Biokhimiia*. – 2018. – T.83, №5. – C.498-506.
175. Naldini L. Medicine. A comeback for gene therapy // *Science (New York, NY)*. – 2009. – T.326, №5954. – C.805-6.
176. Herzog R.W., Cao O., Srivastava A. Two decades of clinical gene therapy--success is finally mounting // *Discovery Medicine*. – 2010. – T.9, №45. – C.105-11.
177. Couzin-Frankel J. Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy // *Science (New York, NY)*. – 2013. – T.342, №6165. – C.1432-3.
178. Williams P.D., Kingston P.A. Plasmid-mediated gene therapy for cardiovascular disease // *Cardiovascular Research*. – 2011. – T.91, №4. – C.565-76.

179. Laitinen M., Pakkanen T., Donetti E., et al. Gene transfer into the carotid artery using an adventitial collar: comparison of the effectiveness of the plasmid-liposome complexes, retroviruses, pseudotyped retroviruses, and adenoviruses // *Human Gene Therapy*. – 1997. – T.8, №14. – C.1645-50.
180. Edwards C.M. GLP-1: target for a new class of antidiabetic agents? // *Journal of the Royal Society of Medicine*. – 2004. – T.97, №6. – C.270-4.
181. Herzberg-Schafer S., Heni M., Stefan N., Haring H.U., Fritsche A. Impairment of GLP1-induced insulin secretion: role of genetic background, insulin resistance and hyperglycaemia // *Diabetes, Obesity & Metabolism*. – 2012. – T.14, №S3. – C.85-90.
182. Dominguez Avila J.A., Rodrigo Garcia J., Gonzalez Aguilar G.A., de la Rosa L.A. The antidiabetic mechanisms of polyphenols related to increased glucagon-like peptide-1 (GLP1) and insulin signaling // *Molecules (Basel, Switzerland)*. – 2017. – T.22, №6.
183. Iwaki M., Matsuda M., Maeda N., et al. Induction of adiponectin, a fat-derived antidiabetic and antiatherogenic factor, by nuclear receptors // *Diabetes*. – 2003. – T.52, №7. – C.1655-63.
184. Kadowaki T., Yamauchi T., Kubota N., Hara K., Ueki K., Tobe K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome // *The Journal of Clinical Investigation*. – 2006. – T.116, №7. – C.1784-92.
185. Fisman E.Z., Tenenbaum A. Adiponectin: a manifold therapeutic target for metabolic syndrome, diabetes, and coronary disease? // *Cardiovascular Diabetology*. – 2014. – T.13. – p.103.
186. Choi S., Oh S., Lee M., Kim S.W. Glucagon-like peptide-1 plasmid construction and delivery for the treatment of type 2 diabetes // *Molecular therapy*. – 2005. – T.12, №5. – C.885-91.
187. Parsons G.B., Souza D.W., Wu H., et al. Ectopic expression of glucagon-like peptide 1 for gene therapy of type II diabetes // *Gene Therapy*. – 2007. – T.14, №1. – C.38-48.

188. Jean M., Alameh M., Buschmann M.D., Merzouki A. Effective and safe gene-based delivery of GLP-1 using chitosan/plasmid-DNA therapeutic nanocomplexes in an animal model of type 2 diabetes // *Gene Therapy*. – 2011. – T.18, №8. – C.807-16.
189. Vilsboll T. Liraglutide: a new treatment for type 2 diabetes // *Drugs of Today*. – 2009. – T.45, №2. – C.101-13.
190. Verges B., Bonnard C., Renard E. Beyond glucose lowering: glucagon-like peptide-1 receptor agonists, body weight and the cardiovascular system // *Diabetes & Metabolism*. – 2011. – T.37, №6. – C.477-88.
191. Garber A.J. Liraglutide in oral antidiabetic drug combination therapy // *Diabetes, Obesity & Metabolism*. – 2012. – T.14, №S2. – C.13-9.
192. Kim P.H., Lee M., Nam K., Kim S.W. Enhanced incretin effects of exendin-4 expressing chimeric plasmid based on two-step transcription amplification system with dendritic bio-reducible polymer for the treatment of type 2 diabetes // *Journal of Gene Therapy*. – 2013. – T.1, №1. – C.7-15.
193. Park J.H., Lee M., Kim S.W. Non-viral adiponectin gene therapy into obese type 2 diabetic mice ameliorates insulin resistance // *Journal of Controlled Release*. – 2006. – T.114, №1. – C.118-25.
194. Nan M.H., Park J.S., Myung C.S. Construction of adiponectin-encoding plasmid DNA and gene therapy of non-obese type 2 diabetes mellitus // *Journal of Drug Targeting*. – 2010. – T.18, №1. – C.67-77.
195. Kandasamy A.D., Sung M.M., Boisvenue J.J., Barr A.J., Dyck J.R. Adiponectin gene therapy ameliorates high-fat, high-sucrose diet-induced metabolic perturbations in mice // *Nutrition & Diabetes*. – 2012. – T.2. – C.e45.
196. Peng H., Sarwar Z., Yang X.P., et al. Profibrotic role for interleukin-4 in cardiac remodeling and dysfunction // *Hypertension*. – 2015. – T.66, №3. – C.582-9.
197. Laudénbach M., Baruffaldi F., Robinson C., et al. Blocking interleukin-4 enhances efficacy of vaccines for treatment of opioid abuse and prevention of opioid overdose // *Scientific Reports*. – 2018. – T.8, №1. – C.5508.

198. Nappo G., Handle F., Santer F.R., et al. The immunosuppressive cytokine interleukin-4 increases the clonogenic potential of prostate stem-like cells by activation of STAT6 signalling // *Oncogenesis*. – 2017. – T.6, №5. – C.e342.
199. Jimenez V., Munoz S., Casana E., et al. In vivo adeno-associated viral vector-mediated genetic engineering of white and brown adipose tissue in adult mice // *Diabetes*. – 2013. – T.62, №12. – C.4012-22.
200. O'Neill S.M., Hinkle C., Chen S.J., et al. Targeting adipose tissue via systemic gene therapy // *Gene Therapy*. – 2014. – T.21, №7. – C.653-61.
201. Gomez-Banoy N., Lo J.C. Genetic manipulation with viral vectors to assess metabolism and adipose tissue function // *Methods in Molecular Biology*. – 2017. – T.1566. – C.109-24.
202. Riedel M.J., Gaddy D.F., Asadi A., Robbins P.D., Kieffer T.J. DsAAV8-mediated expression of glucagon-like peptide-1 in pancreatic beta-cells ameliorates streptozotocin-induced diabetes // *Gene Therapy*. – 2010. – T.17, №2. – C.171-80.
203. Lee Y., Kwon M.K., Kang E.S., et al. Adenoviral vector-mediated glucagon-like peptide 1 gene therapy improves glucose homeostasis in Zucker diabetic fatty rats // *The Journal of Gene Medicine*. – 2008. – T.10, №3. – C.260-8.
204. Tasyurek H.M., Altunbas H.A., Balci M.K., Griffith T.S., Sanlioglu S. Therapeutic potential of lentivirus-mediated glucagon-like peptide-1 gene therapy for diabetes // *Human Gene Therapy*. – 2018. – T.29, №7. – C.802-15.
205. Kojima S., Asakawa A., Amitani H., et al. Central leptin gene therapy, a substitute for insulin therapy to ameliorate hyperglycemia and hyperphagia, and promote survival in insulin-deficient diabetic mice // *Peptides*. – 2009. – T.30, №5 – C.962-6.
206. Wang Y., Asakawa A., Inui A., Kosai K.. Leptin gene therapy in the fight against diabetes // *Expert Opinion on Biological Therapy*. – 2010. – T.10, №10. – C.1405-14.

207. DeFronzo R.A., Tobin J.D., Andres R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance // *The American Journal of Physiology*. – 1979. – T.237, №3. – C.E214-23.
208. Schmittgen T.D., Livak K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method // *Nature Protocols*. – 2008. – T.3, №6. – C.1101-8.
209. Zebisch K., Voigt V., Wabitsch M., Brandsch M. Protocol for effective differentiation of 3T3-L1 cells to adipocytes // *Analytical Biochemistry*. – 2012. – T.425, №1. – C.88-90.
210. She M., Hou H., Wang Z., Zhang C., Laudon M., Yin W. Melatonin rescues 3T3-L1 adipocytes from FFA-induced insulin resistance by inhibiting phosphorylation of IRS-1 on Ser307 // *Biochimie*. – 2014. – T.103. – C.126-30.
211. Svedberg J., Bjorntorp P., Smith U., Lonnroth P. Free-fatty acid inhibition of insulin binding, degradation, and action in isolated rat hepatocytes // *Diabetes*. – 1990. – T.39, №5. – C.570-4.
212. Citterio C., Vichi A., Pacheco-Rodriguez G., Aponte A.M., Moss J., Vaughan M. Unfolded protein response and cell death after depletion of brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein GBF1 // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2008. – T.105, №8. – C.2877-82.
213. Glassford A.J., Yue P., Sheikh A.Y., et al. HIF-1 regulates hypoxia- and insulin-induced expression of apelin in adipocytes // *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism*. – 2007. – T.293, №6. – C.E1590-6.
214. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. – 1970. – T.227, №5259. – C.680-5.
215. Martinez F.O., Gordon S., Locati M., Mantovani A. Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression // *Journal of Immunology*. – 2006. – T.177, №10. – C.7303-11.

216. Xuan W., Qu Q., Zheng B., Xiong S., Fan G.H. The chemotaxis of M1 and M2 macrophages is regulated by different chemokines // *Journal of Leukocyte Biology*. – 2015. – T.97, №1. – C.61-9.
217. Yang J., Eliasson B., Smith U., Cushman S.W., Sherman A.S. The size of large adipose cells is a predictor of insulin resistance in first-degree relatives of type 2 diabetic patients // *Obesity (Silver Spring, Md)*. – 2012. – T.20, №5. – C.932-8.
218. Vieira-Potter V.J. Inflammation and macrophage modulation in adipose tissues // *Cellular Microbiology*. – 2014. – T.16, №10. – C.1484-92.
219. Fujisaka S., Usui I., Bukhari A., et al. Regulatory mechanisms for adipose tissue M1 and M2 macrophages in diet-induced obese mice // *Diabetes*. – 2009. – T.58, №11. – C.2574-82.
220. Molofsky A.B., Nussbaum J.C., Liang H.E., et al. Innate lymphoid type 2 cells sustain visceral adipose tissue eosinophils and alternatively activated macrophages // *The Journal of Experimental Medicine*. – 2013. – T.210, №3. – C.535-49.
221. Cautivo K.M., Molofsky A.B. Regulation of metabolic health and adipose tissue function by group 2 innate lymphoid cells // *European Journal of Immunology*. – 2016. – T.46, №6. – 1315-25.
222. Wellen K.E., Hotamisligil G.S. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue // *The Journal of Clinical Investigation*. – 2003. – T.112, №12. – C.1785-8.
223. Wellen K.E., Hotamisligil G.S. Inflammation, stress, and diabetes // *The Journal of Clinical Investigation*. – 2005. – T.115, №5. – C.1111-9.
224. Morris D.L., Singer K., Lumeng C.N. Adipose tissue macrophages: phenotypic plasticity and diversity in lean and obese states // *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. – 2011. – T.14, №4. – C.341-6.
225. Hill A.A., Reid Bolus W., Hasty A.H. A decade of progress in adipose tissue macrophage biology // *Immunological Reviews*. – 2014. – T.262, №1. – C.134-52.

226. Richardson V.R., Smith K.A., Carter A.M. Adipose tissue inflammation: Feeding the development of type 2 diabetes mellitus // *Immunobiology*. – 2013. – T.218, №12. – C.1497-504.
227. Kohlgruber A., Lynch L. Adipose tissue inflammation in the pathogenesis of type 2 diabetes // *Current Diabetes Reports*. – 2015. – T.15, №11. – C.92.
228. Corominola H., Conner L.J., Beavers L.S., et al. Identification of novel genes differentially expressed in omental fat of obese subjects and obese type 2 diabetic patients // *Diabetes*. – 2001. – T.50, №12. – C.2822-30.
229. Poulain-Godefroy O., Lecoœur C., Pattou F., Frühbeck G., Froguel P. Inflammation is associated with a decrease of lipogenic factors in omental fat in women // *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. – 2008. – T.295, №1. – C.R1-R7.
230. Tordjman J., Poitou C., Hugol D., et al. Association between omental adipose tissue macrophages and liver histopathology in morbid obesity: Influence of glycemic status // *Journal of Hepatology*. – 2009. – T.51, №2. – C.354-62.
231. Coats B.R., Schoenfelt K.Q., Barbosa-Lorenzi V.C., et al. Metabolically activated adipose tissue macrophages perform detrimental and beneficial functions during diet-induced obesity // *Cell Reports*. – 2017. – T.20, №13. – C.3149-61.
232. García-Ruiz I., Solís-Muñoz P., Fernández-Moreira D., Grau M., Muñoz-Yagüe M.T., Solís-Herruzo J.A. Omentectomy prevents metabolic syndrome by reducing appetite and body weight in a diet-induced obesity rat model // *Scientific reports*. – 2018. – T.8, №1. – C.1540.
233. Macdougall C.E., Wood E.G., Loschko J., et al. Visceral adipose tissue immune homeostasis is regulated by the crosstalk between adipocytes and dendritic cell subsets // *Cell Metabolism*. – 2018. – T.27, №3. – C.588-601 e4.
234. Aguirre V., Uchida T., Yenush L., Davis R., White M.F. The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307) // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2000. – T.275, №12. – C.9047-54.

235. Solinas G., Karin M. JNK1 and IKKbeta: molecular links between obesity and metabolic dysfunction // *FASEB Journal*. – 2010. – T.24, №8. – C.2596-611.
236. Solinas G., Becattini B. JNK at the crossroad of obesity, insulin resistance, and cell stress response // *Molecular Metabolism*. – 2017. – T.6, №2. – C.174-84.
237. Dubois S.G., Heilbronn L.K., Smith S.R., Albu J.B., Kelley D.E., Ravussin E. Decreased expression of adipogenic genes in obese subjects with type 2 diabetes // *Obesity (Silver Spring, Md)*. – 2006. – T.14, №9. – C.1543-52.
238. Isakson P., Hammarstedt A., Gustafson B., Smith U. Impaired preadipocyte differentiation in human abdominal obesity: role of Wnt, tumor necrosis factor-alpha, and inflammation // *Diabetes*. – 2009. – T.58, №7. – C.1550-7.
239. Arner P., Arner E., Hammarstedt A., Smith U. Genetic predisposition for Type 2 diabetes, but not for overweight/obesity, is associated with a restricted adipogenesis // *PLoS One*. – 2011. – T.6, №4. – C.e18284.
240. Gustafson B., Hedjazifar S., Gogg S., Hammarstedt A., Smith U. Insulin resistance and impaired adipogenesis // *Trends in Endocrinology and Metabolism*. – 2015. – T.26, №4. – C.193-200.
241. Delarue J., Magnan C. Free fatty acids and insulin resistance // *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. – 2007. – T.10, №2. – C.142-8.
242. Virkamaki A., Yki-Jarvinen H. Mechanisms of insulin resistance during acute endotoxemia // *Endocrinology*. – 1994. – T.134, №5. – C.2072-8.
243. Humphrey S.J., Yang G., Yang P., et al. Dynamic adipocyte phosphoproteome reveals that Akt directly regulates mTORC2 // *Cell Metabolism*. – 2013. – T.17, №6. – C.1009-20.
244. Hotamisligil G.S., Erbay E. Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases // *Nature Reviews Immunology*. – 2008. – T.8, №12. – C.923-34.
245. Samuel V.T., Shulman G.I. Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links // *Cell*. – 2012. – T.148, №5. – C.852-71.
246. Hauner H. The mode of action of thiazolidinediones // *Diabetes & Metabolism: Research and Reviews*. – 2002. – T.18, №S2. – C.S10-5.

247. Wang Y.W., He S.J., Feng X., et al. Metformin: a review of its potential indications // *Drug Design, Development and Therapy*. – 2017. – T.11. – C.2421-9.
248. Koller F.L., Hwang D.G., Dozier E.A., Fingleton B. Epithelial interleukin-4 receptor expression promotes colon tumor growth // *Carcinogenesis*. – 2010. – T.31, №6. – C.1010-7.
249. Goldstein R., Hanley C., Morris J., et al. Clinical investigation of the role of interleukin-4 and interleukin-13 in the evolution of prostate cancer // *Cancers*. – 2011. – T.3, №4. – C.4281-93.
250. Huaux F., Liu T., McGarry B., Ullenbruch M., Phan S.H. Dual roles of IL-4 in lung injury and fibrosis // *Journal of Immunology*. – 2003. – T.170, №4. – C.2083-92.
251. Groves A.M., Johnston C.J., Misra R.S., Williams J.P., Finkelstein J.N. Effects of IL-4 on pulmonary fibrosis and the accumulation and phenotype of macrophage subpopulations following thoracic irradiation // *International Journal of Radiation Biology*. – 2016. – T.92, №12. – C.754-65.
252. Steinke J.W., Borish L. Th2 cytokines and asthma. Interleukin-4: its role in the pathogenesis of asthma, and targeting it for asthma treatment with interleukin-4 receptor antagonists // *Respiratory Research*. – 2001. – T.2, №2. – C.66-70.
253. Mendonca M.S., Peracoli T.S., Silva-Vergara M.L., et al. High interleukin-4 expression and interleukin-4 gene polymorphisms are associated with susceptibility to human paracoccidioidomycosis // *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. – 2015. – T.110, №6. – C.781-5.
254. Lively S., Hutchings S., Schlichter L.C. Molecular and cellular responses to interleukin-4 treatment in a rat model of transient ischemia // *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. – 2016.
255. Paul W.E. Interleukin 4: signalling mechanisms and control of T cell differentiation // *Ciba Foundation Symposium*. – 1997. – T.204. – C.208-16.

256. Kim H.W., Lee J.E., Cha J.J., et al. Fibroblast growth factor 21 improves insulin resistance and ameliorates renal injury in db/db mice // *Endocrinology*. – 2013. – T.154, №9. – C.3366-76.
257. Hur K.Y. Is GDF15 a novel biomarker to predict the development of prediabetes or diabetes? // *Diabetes & Metabolism Journal*. – 2014. – T.38, №6. – C.437-8.
258. Omar B.A., Andersen B., Hald J., Raun K., Nishimura E., Ahren B. Fibroblast growth factor 21 (FGF21) and glucagon-like peptide 1 contribute to diabetes resistance in glucagon receptor-deficient mice // *Diabetes*. – 2014. – T.63, №1. – C.101-10.
259. Adela R., Banerjee S.K. GDF-15 as a target and biomarker for diabetes and cardiovascular diseases: a translational prospective // *Journal of Diabetes Research*. – 2015. – T.2015. – Номер статьи 490842.
260. Kim K.H., Kim S.H., Han D.H., Jo Y.S., Lee Y.-H., Lee M.-S. Growth differentiation factor 15 ameliorates nonalcoholic steatohepatitis and related metabolic disorders in mice // *Scientific Reports*. – 2018. – T.8, №1. – C.6789.