

УДК 577.1

## ХИМИЧЕСКИЕ ИНДУКТОРЫ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СТРЕССА, СВЯЗАННОГО С ОЖИРЕНИЕМ, АКТИВИРУЮТ ВОСПАЛЕНИЕ, СНИЖАЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К ИНСУЛИНУ В АДИПОЦИТАХ 3T3-L1

© 2019 Ю.С. Стафеев<sup>1,2\*</sup>, С.С. Мичурина<sup>1,3</sup>, Н.В. Подкуйченко<sup>1,3</sup>,  
М.Ю. Меньшиков<sup>1</sup>, Е.В. Парфёнова<sup>1,2#</sup>, А.В. Воротников<sup>1,4#\*</sup>

<sup>1</sup> НИИ экспериментальной кардиологии, НМИЦ кардиологии, 121552 Москва, Россия; электронная почта: yuristafeev@gmail.com, a.vorotnikov@icloud.com

<sup>2</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет фундаментальной медицины, 117192 Москва, Россия

<sup>3</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119991 Москва, Россия

<sup>4</sup> Медицинский научно-образовательный центр, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 08.10.2018

После доработки 23.01.2019

Принята к публикации 23.01.2019

Ожирение сопровождается развитием дислипидемии, гипоксии, стресса эндоплазматического ретикулума (ЭПР) и воспаления, являясь основным фактором риска развития инсулиновой резистентности и сахарного диабета 2-го типа. Мы смоделировали эти состояния в культивируемых адипоцитах 3T3-L1, определив их влияние на инсулиновую сигнализацию, транспорт глюкозы в клетки и развитие воспалительной реакции по активации стресс-зависимых киназ JNK1/2. Во всех условиях жировой перегрузки клеток при культивировании с пальмитатом, острого воспаления при обработке клеток бактериальным липополисахаридом, индукции гипоксии солями двухвалентного кобальта или стресса ЭПР, вызванного обработкой клеток брэфелдином А, наблюдалось снижение активации инсулином фосфорилирования компонентов инсулинового каскада IRS, Akt и AS160. Во всех условиях, кроме острого воспаления, снижался инсулин-зависимый захват глюкозы адипоцитами, а кинетика активации JNK1/2 была двухфазной, демонстрируя повышенную активность в течение 24 ч. Напротив, в случае острого воспаления кинетика активирующего фосфорилирования JNK1/2 была транзитной, и уровень фосфорилирования JNK возвращался к базальному уровню через 2–3 ч стимуляции. Эти результаты указывают на ключевую роль длительного (латентного), но не быстрого (острого) воспаления в индукции инсулиновой резистентности и в нарушении утилизации глюкозы жировой тканью. Таким образом, участники воспалительного сигнального каскада могут быть перспективными мишенями при разработке новых терапевтических подходов к коррекции инсулиновой резистентности и сахарного диабета 2-го типа.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** инсулиновая резистентность, сахарный диабет 2-го типа, воспаление, транспорт глюкозы, адипоциты.

DOI: 10.1134/S0320972519050099

Ожирение является одной из ключевых проблем в современном обществе [1]. Ожирение существенно повышает риск развития сахарного диабета 2-го типа (СД2Т), метаболического

синдрома, сердечно-сосудистых осложнений и ряда онкологических заболеваний. В России СД2Т диагностирован у 2,8% населения (~4,2 млн человек). Кроме того, количество пациентов с

Принятые сокращения: БрА – брэфелдин А; DMEM – модифицированная Дальбекко среда Игла; ИР – инсулиновая резистентность; TBST – Tris-HCl-буфер с добавлением 0,1% Tween 20; ЛПС – бактериальный липополисахарид; СД2Т – сахарный диабет 2-го типа; СЖК – свободные насыщенные жирные кислоты (в данной работе – пальмитат); ЭПР – эндоплазматический ретикулум; Akt – протеинкиназа B; AS160 – субстрат Akt массой 160 кДа; FBS – фетальная бычья сыворотка; GLUT4 – глюкозный транспортер 4-го типа; HIF-1 $\alpha$  – фактор 1 $\alpha$ , индуцируемый гипоксией; IRS – субстрат рецептора инсулина; JNK – киназа N-концевого домена белка c-Jun (c-Jun N-terminal kinase); mTORC2 – второй белковый комплекс мишени рапамицина (mammalian target of rapamycin complex 2); NBCS – сыворотка новорожденных телят; P13-киназа – фосфатидилинозитол-3'-киназа.

\* Адресат для корреспонденции.

# Авторы внесли равный вклад в работу.

избыточным весом стремительно растет как среди взрослых, так и среди детей [2, 3]. Вместе с тем наблюдается существенное отставание отечественной науки от мировой в изучении клеточных и молекулярных механизмов метаболических нарушений, в т.ч. связанных с СД2Т и ожирением.

Первичным звеном в развитии СД2Т является инсулиновая резистентность (ИР). Она выражается в потере чувствительности клеток-мишеней к инсулину и неспособности инсулина обеспечить захват глюкозы из крови [4]. В результате развивается устойчивая гипергликемия, показателем которой служит рост уровня гликированного гемоглобина А1С. Несмотря на большой прогресс, достигнутый в области медикаментозной коррекции этих показателей при лечении СД2Т [2], практически нерешенным остается вопрос терапии и профилактики ИР как первичного звена патогенеза СД2Т. Во многом это связано с недостатком знаний о механизмах развития ИР в главных клетках-мишенях инсулина – адипоцитах, миоцитах и гепатоцитах.

Клеточные механизмы развития ИР связывают с нарушением передачи сигнала инсулина внутрь клеток, что приводит к снижению выхода инсулин-зависимого транспортера глюкозы GLUT4 на клеточную мембрану. Сигнальный каскад инсулина включает активацию рецептора инсулина, тирозинное фосфорилирование субстрата инсулинового рецептора (IRS) по остатку Tyr612, активацию PI3-киназного каскада, активацию киназы Akt путем двойного фосфорилирования по остаткам Thr308 и Ser473 и фосфорилирование ею белка AS160, который физически регулирует перемещение GLUT4 на мембрану [5–7]. Фосфорилирование Thr308 в составе Akt опосредовано PI3K-зависимой фосфоинозитид-зависимой киназой PDK1, тогда как за фосфорилирование Ser473 отвечает белковый комплекс mTORC2, активность которого, по крайней мере частично, также зависит от PI3-киназы [6]. Активация инсулинового каскада нарушается в результате фосфорилирования IRS по остаткам серина различными протеинкиназами, что снижает сигнал-проводящую способность IRS [7, 8].

Долгое время считалось, что участие разных сериновых киназ, подавляющих функцию IRS и ведущих к развитию ИР, определяется разными патологическими состояниями, связанными с ожирением. В зависимости от типа ткани в качестве таких состояний рассматривались дислипидемия, воспаление, гипоксия, окислительный стресс, пищевая перегрузка и стресс эндоплазматического ретикулума (ЭПР) [7, 9–12]. Были

сделаны попытки систематизировать данные о преимущественном фосфорилировании отдельных сериновых остатков IRS определенными киназами в разных условиях [13–15]. Выявлена довольно мозаичная картина, что указывает на отсутствие строгой специфичности и вероятность наличия более общего механизма индукции ИР. Использование животных моделей с генетическим нокаутом показало, что воспалительные киназы, такие как IKK $\beta$ / $\epsilon$  и JNK1/2, могут играть ведущую роль в жировой ткани [16–19], а латентное воспаление может быть тем общим механизмом, который объединяет воздействие факторов риска. Связь ожирения с воспалением в жировой ткани хорошо документирована [20–22], хотя до сих пор нет единого мнения о том, что из них является причиной, а что – следствием [23]. Однако существует несколько возможных путей взаимодействия воспалительного и инсулинового каскадов в клетке [12], однозначности в этом вопросе также нет. Тем не менее противовоспалительная терапия восстанавливает чувствительность к инсулину как на системном уровне [24, 25], так и в культуре модельных адипоцитов 3T3-L1 [26].

Целью данного исследования являлось моделирование патологических состояний, ассоциированных с ожирением, и выяснение их влияния на инсулиновую сигнализацию, захват глюкозы и фосфорилирование киназы JNK в модели культивируемых адипоцитов 3T3-L1.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Культивирование и дифференцировка преадипоцитов 3T3-L1.** Преадипоциты мыши 3T3-L1 приобретали в ATCC (Американская коллекция стандартных клеточных культур) и культивировали в среде DMEM с высоким содержанием глюкозы (4,5 г/л глюкозы, 110 мг/л пирувата натрия, 2 мМ L-глутамин,  $6 \cdot 10^4$  ед/л пенициллина,  $6 \cdot 10^4$  ед/л стрептомицина) и добавлением 10% FBS («HyClone», США или «Biological Industries», Израиль). Адипогенную дифференцировку проводили в течение 10 дней, как описано ранее [26, 27]. Для этого преадипоциты 3T3-L1 предварительно культивировали в течение двух дней до конfluence ~90% и еще один день в среде DMEM с добавлением 10% NBCS телят (newborn calf serum; «Gibco», США). На 3-й день среду заменяли на DMEM с добавлением 10% FBS, 0,5 мМ дексаметазона, 0,25 мкМ изобутилметилксантина, 2 мкМ розиглитазона и 1 мкг/мл инсулина (все реактивы «Sigma-Aldrich», США), которую меняли ежедневно в течение 2–3 дней. На 5-й день среду заменяли

на DMEM с добавлением 10% FBS и 1 мкг/мл инсулина. На 7-й день дифференцированные адипоциты переводили в DMEM с высоким содержанием глюкозы и добавлением 10% FBS. Эксперименты проводили с 10-го по 14-й день, контрольные клетки фиксировали с помощью 4%-ного формальдегида в течение 1 ч и окрашивали липофильным красителем Oil Red O («Merck Millipore», США).

**Моделирование инсулиновой резистентности. Липид-зависимая ИР.** Липид-зависимую ИР индуцировали согласно протоколу She et al. [28] с изменениями. Для зрелых адипоцитов 3T3-L1 проводили депривацию от FBS в течение 24 ч в DMEM с добавлением 0,5% БСА. После этого на 24 ч добавляли 0,3 мМ конъюгат пальмитата с БСА (СЖК), приготовленный по протоколу Svedberg et al. [29]. Далее оценивали чувствительность клеток к инсулину, анализируя уровень активирующего фосфорилирования основных участников инсулинового каскада и влияние инсулина на GLUT4-зависимый захват клетками негидролизованного аналога глюкозы, [<sup>3</sup>H]-2-дезоксиглюкозы, как описано ниже.

**Воспаление.** Воспаление индуцировали, обрабатывая зрелые адипоциты 3T3-L1 ЛПС (*E. coli*, серотип 0111:B4; «Sigma», США) до конечной концентрации 50 нг/мл в течение 24 ч в среде DMEM с добавлением 10% FBS. После этого проводили депривацию клеток от FBS в течение 4 ч в DMEM с высоким содержанием глюкозы и измеряли их чувствительность к инсулину, анализируя уровень активирующего фосфорилирования основных участников инсулинового каскада и влияние инсулина на GLUT4-зависимый захват клетками негидролизованного аналога глюкозы, [<sup>3</sup>H]-2-дезоксиглюкозы, как описано ниже.

**Стресс ЭПР.** Стресс ЭПР вызывали согласно методике Citterio et al. [30] с изменениями. Зрелые адипоциты 3T3-L1 обрабатывали брэфелдином А (БрА) в конечной концентрации 100 мкМ в течение 24 ч в среде DMEM с добавлением 10% FBS. После этого проводили депривацию клеток от FBS в течение 4 ч и анализировали активность инсулин-зависимого сигнального каскада и захвата [<sup>3</sup>H]-2-дезоксиглюкозы, как описано ниже.

**Гипоксия.** Клеточную модель ответа на гипоксию создавали согласно протоколу Glassford et al. [31], стабилизируя транскрипционный фактор HIF-1 $\alpha$  ионами двухвалентного кобальта. Зрелые адипоциты 3T3-L1 обрабатывали CoCl<sub>2</sub> в конечной концентрации 100 мкМ в течение 24 ч в среде DMEM с высоким содержанием глюкозы и добавлением 10% FBS, после чего проводили депривацию клеток в течение 4 ч в бессывороточной среде DMEM с высоким

содержанием глюкозы и 100 мкМ CoCl<sub>2</sub> и анализировали активность инсулин-зависимого сигнального каскада и захвата [<sup>3</sup>H]-2-дезоксиглюкозы, как описано ниже.

**Определение динамики воспалительной реакции.** Клетки обрабатывали СЖК, ЛПС, БрА или CoCl<sub>2</sub> в течение 30 мин; 1, 2, 8 или 24 ч. Концентрации индукторов соответствовали концентрациям, использованным при моделировании ИР. Кинетику воспалительной реакции зрелых адипоцитов 3T3-L1 в моделях ИР оценивали по усилению активирующего фосфорилирования остатков Thr183/Tyr185 в активационной петле стресс-зависимых киназ JNK1/2 (далее – JNK) с помощью иммуноблоттинга.

**Иммуноблоттинг.** Метод иммуноблоттинга использовали для сравнения активации фосфорилирования белков инсулинового каскада в моделях инсулиновой резистентности (см. подраздел «Моделирование инсулиновой резистентности») и для оценки кинетики фосфорилирования JNK как воспалительной реакции в данных моделях (см. подраздел «Определение динамики воспалительной реакции»). Клетки лизировали на льду в RIPA-буфере (RadioImmuno-Precipitation Assay; 150 мМ NaCl, 1% Triton X-100, 0,5% дезоксихолата натрия, 0,1% додецилсульфата натрия, 50 мМ Tris-HCl, pH 8,0), содержащем ингибиторы протеаз (cOmplete Tablets EASY-pack; «Roche», Швейцария) и фосфатаз (10 мМ глицерофосфат натрия, 20 мМ пиррофосфат натрия, 10 мМ фторид натрия, 1 мМ ортованадат натрия). Клеточные лизаты разделяли с помощью SDS-электрофореза по Лэммли [32]. Электроперенос белков проводили на поливинилиденфторидные (PVDF) мембраны в режиме не менее 1 А · ч. Мембраны блокировали в течение минимум 2 ч в 5%-ном растворе обезжиренного молока («AppliChem», Германия) в TBST-буфере (50 мМ Tris-HCl, 150 мМ NaCl, 0,1% Tween 20, pH 7,5) и последовательно обрабатывали первичными и вторичными антителами в 1%-ном растворе молока в TBST-буфере в разведениях, рекомендуемых производителем.

Активацию инсулинового каскада определяли по фосфорилированию белков IRS-1, Akt и AS160. Для этого использовали антитела к фосфо-Tyr612 в IRS-1 (#44816; «Thermo Fischer Scientific», США); антитела к IRS-1 (3407; «Cell Signaling Technology», США), к фосфо-Thr308 в Akt (9275; «Cell Signaling Technology», США), к фосфо-Ser473 в Akt (4060; «Cell Signaling Technology», США), к Akt (ab64148; «Abcam», США); к фосфо-Ser318 в AS160 (8619; «Cell Signaling Technology», США), к AS160 (2670; «Cell Signaling Technology», США), к винкулину (ab18058; «Abcam», США) и вторичное антитело к IgG кролика, конъюгиро-

ванное с пероксидазой хрена (ab6721; «Abcam», США). Активацию киназы JNK определяли с помощью фосфоспецифичных антител к фосфо-Thr183/фосфо-Tyr185 в составе JNK1/2 (AF1205; «R&D Systems», США) и тотальных антител к JNK1/2 (AF1387; «R&D Systems», США).

Белковые полосы визуализировали с использованием хемилюминесценции, реактивов Clarity ECL («Bio-Rad», США) и гель-документирующей системы FusionX («Vilber Lourmat», Франция) в накопительном режиме. Для количественной денситометрии использовали программу GelAnalyzer2010a. Результаты представляли в виде гистограмм с параметром «Стимуляция фосфорилирования по активационному остатку», который отражает возрастание уровня фосфорилирования остатка исследуемого белка в ответ на стимуляцию инсулином. Относительный уровень фосфорилирования данного белка вычисляли как отношение интенсивности хемилюминесценции фосфорилированной формы белка к интенсивности хемилюминесценции тотальной формы белка. После этого рассчитывали стимуляцию фосфорилирования инсулином как отношение уровня фосфорилирования после стимуляции инсулином к уровню фосфорилирования в нестимулированных клетках.

**Измерение инсулин-индуцируемого захвата  $[^3\text{H}]-2$ -дезоксиглюкозы.** После моделирования условий инсулиновой резистентности в течение 24 ч в адипоцитах измеряли инсулин-зависимый вход глюкозы. Проводили депривацию адипоцитов от FBS в среде DMEM с высоким содержанием глюкозы и 0,1% БСА в течение 4 ч, после чего промывали 3 раза DMEM без глюкозы. Далее добавляли инсулин до концентрации 100 нМ на 20 мин. Для определения захвата глюкозы через инсулин-независимые транспортеры в контрольные пробы добавляли цитохалазин В до 20 мкМ на 20 мин. После этого среды с инсулином и цитохалазином В заменяли на среду, содержащую 100 мкМ 2-дезоксиглюкозы + 0,5 мкКи  $[^3\text{H}]-2$ -дезоксиглюкозы (NET328A001MC; «Perkin-Elmer», США). Через 10 мин клетки осторожно промывали дважды ледяным фосфатно-солевым буфером и замораживали при  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  для нарушения целостности клеточной мембраны. Далее клетки размораживали, лизировали в 300 мкл RIPA-буфера и отбирали 100 мкл для измерения концентрации белка с использованием бицинониновой кислоты (Pierce BCA Protein Assay Kit, #23225; «Thermo Scientific», США). Оставшиеся 200 мкл лизата растворяли в сцинтилляционной жидкости Beckman Ready-Solv HP (#158726; «Beckman», США), измеряли число распадов (с.р.м.) на счетчике RackBeta («LKB Wallac», Швеция) и нормировали результаты на количест-

во белка в образце. Из полученных значений вычитали значения, полученные в образцах с цитохалазином В, нивелируя таким образом вклад инсулин-независимого транспорта глюкозы.

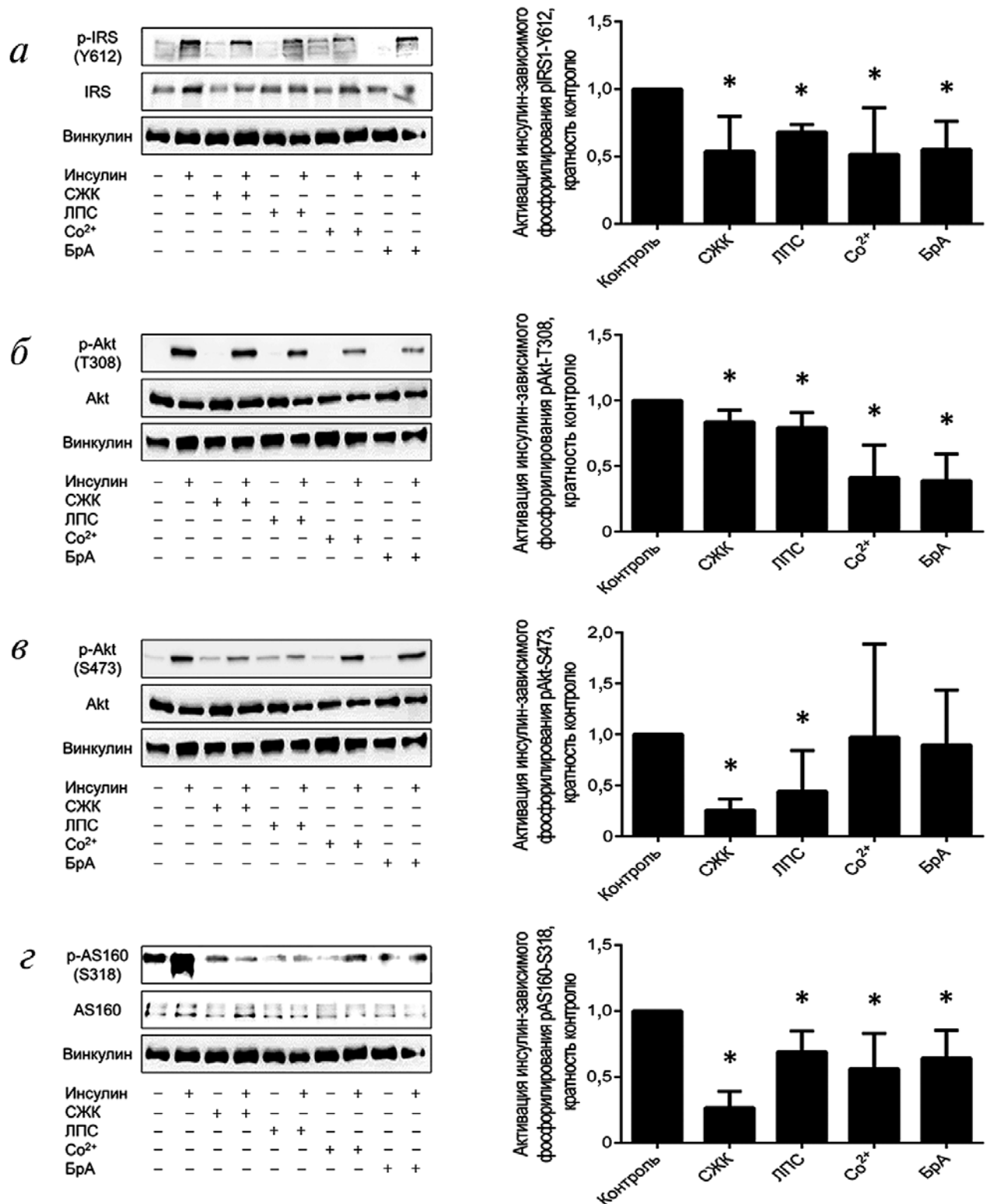
**Статистический анализ.** Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета программ Microsoft Excel 2007. Результаты представлены на гистограммах как средние значения  $\pm$  стандартные отклонения. Для расчета достоверности различий использовали двухвыборочный  $t$ -критерий с различной дисперсией выборок, различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Химические индукторы ИР снижают активацию инсулинового каскада в адипоцитах 3T3-L1.** Тирозинное фосфорилирование IRS по остатку Tyr612 обеспечивает начальный этап передачи инсулинового сигнала в направлении PI3-киназного каскада [5]. На рис. 1, а показано, что стимуляция инсулином фосфорилирования этого остатка в IRS снижается после обработки зрелых адипоцитов 3T3-L1 любым из химических индукторов ИР. Эти результаты указывают на инактивацию инсулинового каскада на уровне IRS в условиях жировой перегрузки клеток, воспаления, гипоксии и стресса ЭПР.

Мишенью PI3-киназного каскада является киназа Akt, активация которой требует фосфорилирования по двум остаткам: Thr308 и Ser473 [6]. На рис. 1, б, в показаны изменения уровня инсулин-зависимого фосфорилирования этих остатков. Все химические индукторы снижали уровень фосфорилирования Akt, но различным образом. В случае Thr308 (рис. 1, б) ЛПС и СЖК незначительно снижали уровень фосфорилирования Thr308. Напротив,  $\text{Co}^{2+}$  и BrA в 2–3 раза снижали активирующее действие инсулина на фосфорилирование Thr308. В отношении Ser473 ситуация была противоположной – ЛПС и СЖК почти в 3 раза снижали уровень фосфорилирования Ser-473, тогда как  $\text{Co}^{2+}$  и BrA были практически неэффективны (рис. 1, в). Однако, учитывая необходимость фосфорилирования обоих остатков для активации Akt, можно считать, что все химические индукторы нарушают активацию инсулином PI3-киназного каскада и Akt как его мишени.

Для того чтобы подтвердить инактивацию инсулинового каскада далее в направлении GLUT4, мы проследили изменения инсулин-зависимого фосфорилирования AS160, являющегося прямым регулятором GLUT4, по остатку Ser318, который служит главной мишенью Akt [33, 34]. Как



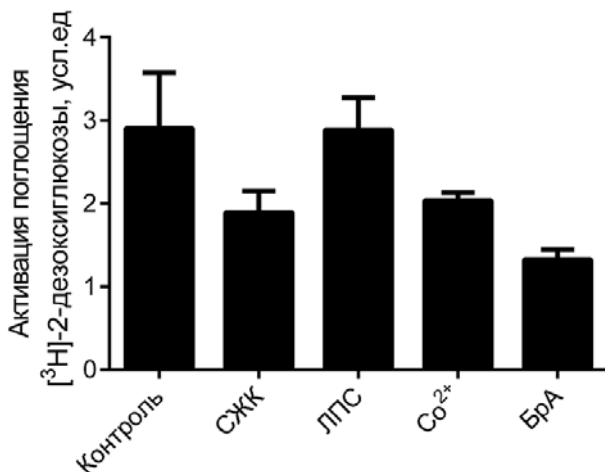
**Рис. 1.** Химические индукторы ИР снижают инсулин-зависимое фосфорилирование основных участников инсулинового сигнального каскада в адипоцитах 3T3-L1. *а* – Репрезентативные результаты вестерн-блоттинга и стимуляция фосфорилирования IRS по остатку Tyr612; *б* – репрезентативные результаты вестерн-блоттинга и стимуляция фосфорилирования Akt по остатку Thr308; *в* – репрезентативные результаты вестерн-блоттинга и стимуляция фосфорилирования Akt по остатку Ser473; *г* – репрезентативные результаты вестерн-блоттинга и стимуляция фосфорилирования AS160 по остатку Ser318. Результаты статистического анализа на диаграммах представлены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение, *t*-критерий Стьюдента; \*  $p < 0,05$ ;  $n = 3$

показано на рис. 1, 2, все химические индукторы ИР снижали инсулин-зависимое фосфорилирование AS160, при этом эффект СЖК был значительно более выраженным.

Таким образом, активация Акт инсулином и дальнейшая передача сигнала к GLUT4 действительно были нарушены в условиях жировой перегрузки, воспаления, гипоксии и стресса ЭПР.

**Все химические индукторы ИР, за исключением ЛПС, снижают инсулин-зависимый захват [<sup>3</sup>H]-2-дезоксиглюкозы адипоцитами 3Т3-L1.** Инсулин-зависимый транспорт глюкозы в клетки измеряли с использованием радиоактивно-меченого аналога глюкозы. Вклад инсулин-независимых транспортеров глюкозы определяли в присутствии цитохалазина В, который блокирует экспонирование GLUT4 на плазматическую мембрану. Как показано на рис. 2, все химические индукторы, за исключением ЛПС, снижали инсулин-индуцируемый захват [<sup>3</sup>H]-2-дезоксиглюкозы. Эти результаты лишь частично согласуются с изменениями активности инсулинового каскада, представленными выше. Несмотря на подавление активации инсулинового каскада, ЛПС фактически не влиял на инсулин-зависимый захват клетками [<sup>3</sup>H]-2-дезоксиглюкозы.

**Все химические индукторы ИР, за исключением ЛПС, вызывают длительную активацию стресс-зависимых киназ JNK1/2 в адипоцитах 3Т3-L1.** Стресс-зависимые киназы JNK1/2 активированы при ожирении и играют важную роль в развитии ИР [12]. Мы проследили кинетику активации JNK1/2 в адипоцитах 3Т3-L1 в процессе химической индукции ИР и обнаружили, что



**Рис. 2.** Влияние химических индукторов ИР на инсулин-зависимый захват [<sup>3</sup>H]-2-дезоксиглюкозы адипоцитами 3Т3-L1. Приведенные значения показывают, во сколько раз инсулин усиливает транспорт глюкозы в клетки. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение, *t*-критерий Стьюдента; \* *p* < 0,05; *n* = 6

фосфорилирование активирующих остатков в JNK1/2 возрастает во всех условиях жировой перегрузки, воспаления, гипоксии и стресса ЭПР, однако кинетика активации JNK1/2 существенно различается (рис. 3).

Уровень фосфорилирования JNK1/2 быстро возрастает после добавления к клеткам индукторов, отражая первую острую воспалительного ответа (1–2 ч). Однако дальнейшая кинетика резко отличается наличием или отсутствием второй продолжительной фазы (3–24 ч). В то время как СЖК и БРА устойчиво повышали уровень фосфорилирования JNK1/2, в случае ЛПС вторая фаза фактически отсутствовала, а в случае Co<sup>2+</sup> вторую фазу наблюдали, но уровень фосфорилирования JNK1/2 снижался к 24 ч обработки.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе мы проверили гипотезу о том, что моделирование *in vitro* различных патологических ситуаций, характерных для ожирения, вызывает ИР и нарушает транспорт глюкозы в адипоциты. Во всех случаях (жировая перегрузка, острое воспаление, гипоксия и стресс ЭПР) снижение активирующего действия инсулина происходило на: 1) начальном уровне IRS; 2) промежуточном уровне мишени PI3-киназного каскада, киназы Akt; 3) конечном этапе мишени инсулинового каскада, AS160, регулирующего активность инсулин-зависимого транспортера глюкозы GLUT4. При этом наблюдалось повышенное фосфорилирование стресс-зависимых киназ JNK1/2, которые активируются при воспалении, однако кинетика активации JNK1/2 была различной. Поскольку JNK1/2 известны как основные сериновые киназы IRS, наши данные указывают на единый воспалительный механизм, обеспечивающий развитие ИР различной этиологии.

**Механизмы снижения активности инсулинового каскада под действием СЖК.** Хорошо известно, что насыщенные СЖК подавляют захват глюкозы из крови инсулин-зависимыми тканями [35, 36]. Этот физиологический феномен, лежащий в основе глюкозо-жирнокислотного цикла Рэндала [35], был подробно описан для мышечных клеток как основных потребителей циркулирующей глюкозы в организме. В меньшей степени он был изучен для адипоцитов, где ключевым событием считалось подавление липолиза под действием избыточно поступающей в клетки глюкозы. Лишь позже было показано, что избыток СЖК (алиментарного или липолитического происхождения) также снижает транс-

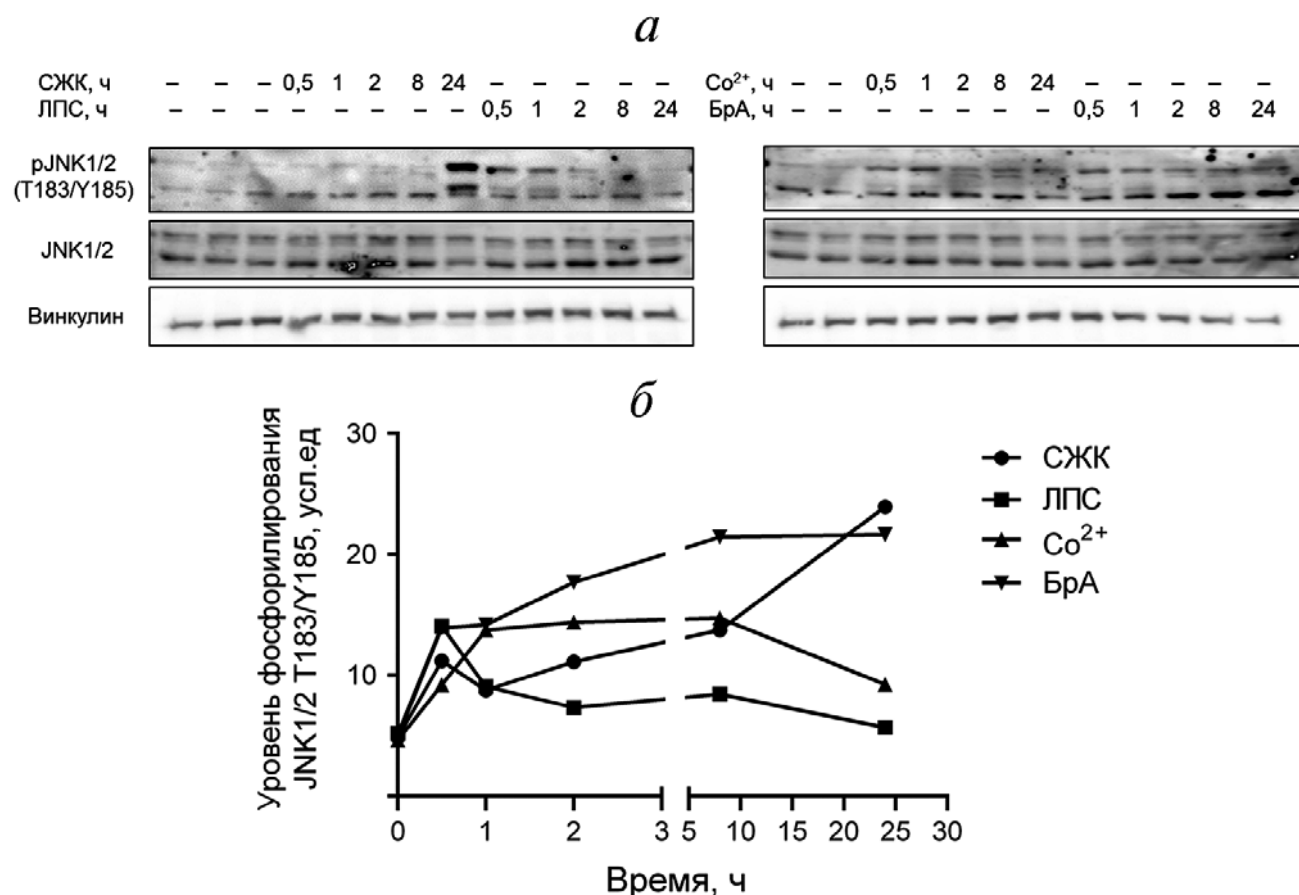
порт глюкозы в адипоциты [37, 38]. Существует огромное число работ, подтверждающих этот феномен [36], но его клеточно-биохимический механизм долгое время был неизвестен.

Исследования 1990-х и 2000-х гг. показали, что в мышечных клетках избыток липидов вызывает активацию атипичных форм протеинкиназы С, которые прерывают передачу сигнала от рецептора инсулина к транспортеру глюкозы GLUT4 [39, 40]. Однако высокий липидный фон в адипоцитах предполагает наличие иного механизма нарушения инсулинового каскада. Понимание данного механизма пришло после идентификации СЖК как активаторов Toll-подобных рецепторов 4-го типа (TLR4) [41, 42]. Эти рецепторы сопряжены с активацией воспалительных каскадов клетки и «воспалительных» киназ IKK и JNK1/2. Участие этих киназ в прерывании инсулинового сигнала на уровне IRS к настоящему времени хорошо документировано [15]. Наконец, ключевая роль JNK в сериновом фосфорилировании IRS и развитии ИР в жировой ткани была убедительно продемонстрирована

на животных и клеточных моделях стресса ЭПР и воспаления [16, 18].

Полученные нами результаты согласуются с этим механизмом, т.к. в модели жировой перегрузки мы наблюдали снижение инсулин-зависимого фосфорилирования IRS по Tyr612, необходимого для дальнейшей передачи сигнала к PI3-киназному каскаду [5], а также фосфорилирования его мишеней Akt и AS160 (рис. 1) и транспорта глюкозы в адипоциты (рис. 2). При обработке клеток СЖК или ЛПС базальный уровень фосфорилирования Ser473 в Akt был повышен (рис. 1, в). Его могут обеспечивать киназы JNK1/2, которые либо напрямую фосфорилируют Ser473 [18], либо активируют mTORC2 [15, 16]. Действительно, мы наблюдали продолжительную активацию JNK1/2 под действием СЖК (рис. 3). Мы также не исключаем других механизмов действия насыщенных СЖК, т.к. механизмы действия СЖК на адипоциты разнообразны [41, 42].

**Механизмы снижения активности инсулинового каскада при гипоксии.** Известно, что разви-



**Рис. 3.** Кинетика фосфорилирования киназы JNK1/2 при обработке адипоцитов 3T3-L1 химическими индукторами ИР. *а* – Репрезентативные иммуноблоты; *б* – график зависимости уровня фосфорилирования JNK1/2 по Thr183 и Tyr185 от времени

тие ожирения и ИР связано с гипертрофией жировой ткани, а развитие гипоксии может быть причиной ИР в адипоцитах [10]. Транскрипционный фактор HIF-1 $\alpha$  обеспечивает реакцию клеток на гипоксию. Ингибирование белков фон Хиппель–Линдау ионами  $Co^{2+}$  предотвращает протеасомную деградацию и стабилизирует HIF-1 $\alpha$  [43, 44]. Одним из целевых генов HIF-комплекса является фактор транскрипции NF- $\kappa$ B. Стабилизация HIF-1 $\alpha$  способствует усилению воспалительных механизмов, зависящих от NF- $\kappa$ B [45, 46]. Кроме того,  $Co^{2+}$  может стимулировать продукцию в клетках активных форм кислорода и развитие окислительного стресса [47]. Таким образом, гипоксия стимулирует активность воспалительных и стресс-зависимых киназ, включая IKK и JNK1/2.

Мы показали, что  $Co^{2+}$  снижает инсулин-стимулируемое фосфорилирование IRS, Akt (по Thr308) и AS160 (рис. 1). Как отмечено выше, за усиление фосфорилирования Akt по Ser473 (рис. 1, в) могут отвечать киназы JNK1/2 [15, 16, 18]. Действительно,  $Co^{2+}$  вызывал продолжительную активацию JNK1/2 (рис. 3), указывая на запуск реакции воспаления. Несмотря на то, что активация JNK1/2 падала к концу эксперимента, инсулин-индуцируемый захват глюкозы достоверно снижался (рис. 2). Таким образом, в условиях экспериментальной гипоксии в адипоцитах развивается ИР и нарушается захват глюкозы, по-видимому, вследствие активации воспалительного ответа с участием JNK1/2.

**Механизмы снижения активности инсулинового каскада при стрессе ЭПР.** Бра нарушает доставку COP1-окаймленных везикул из ЭПР в аппарат Гольджи, вызывая белковую перегрузку и стресс ЭПР [48]. Механизм действия Бра связан с участием воспалительного транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B [49].

Бра снижал инсулин-зависимое фосфорилирование IRS, Akt (по Thr308) и AS160 (рис. 1), показывая тенденцию к росту фосфорилирования Akt по Ser473 относительно других индукторов ИР (рис. 1, в). Стимуляция инсулином захвата глюкозы также достоверно снижалась (рис. 2). Кинетика активации JNK1/2 показывала наличие продолжительной фазы, что согласуется с ролью JNK1/2 в сериновом фосфорилировании IRS и индукции ИР в адипоцитах. Таким образом, моделирование стресса ЭПР также приводит к развитию воспалительной реакции и нарушению транспорта глюкозы в адипоциты.

**Механизмы снижения активности инсулинового каскада при воспалении.** К настоящему времени сформировалась довольно четкая картина, показывающая связь ожирения, воспаления и развития ИР в жировой ткани [19, 50]. Ключе-

вой особенностью этого механизма развития ИР является длительный (латентный) характер воспаления [9, 12].

Классическая индукция воспаления с помощью ЛПС приводила к подавлению инсулин-зависимой сигнализации в адипоцитах (рис. 1), но не вызывала статистически значимого снижения инсулин-индуцируемого захвата глюкозы (рис. 2). ЛПС быстро активировал JNK1/2, но эта активация уменьшалась уже через 4 ч, и вторая фаза продолжительной активации JNK1/2 фактически отсутствовала (рис. 3). Такая картина соответствует острой воспалительной реакции при активации сигнального каскада IKK/NF- $\kappa$ B через рецептор TLR4 на поверхности адипоцитов. Возможно, отсутствие эффекта ЛПС на инсулин-зависимый захват глюкозы (рис. 2) связано именно с отсутствием фазы продолжительной активации JNK1/2, а также с различной реактивностью изоформ JNK1/2. В то время как СЖК,  $Co^{2+}$  и Бра влияли преимущественно на фосфорилирование JNK2, ЛПС изменял фосфорилирование JNK1 (рис. 3). Интересно, что изоформы JNK1/2 могут быть по-разному задействованы в регуляции метаболизма. Так, реакция инсулинового каскада на воспаление полностью отсутствовала у мышей, нокаутных по JNK1, но не JNK2 [16]. Однако этот эффект требовал наличия JNK2 и нарушался в случае нокаута JNK2 [18]. Таким образом, обе изоформы киназы JNK играют важные, но разные роли в развитии ИР воспалительного генеза [50].

Являясь фактором острого воспаления, ЛПС лишь кратковременно активирует JNK1/2, и этого, видимо, недостаточно для критических нарушений функций AS160 и GLUT4. Тот факт, что ЛПС снижает уровень фосфорилирования AS160 по Ser318 (рис. 1, г), однозначно не указывает на изменение активности AS160. Хотя этот остаток является основной мишенью Akt, AS160 несет несколько других остатков, узнаваемых Akt [33, 34]. Кроме того, активность AS160 регулируется другими киназами. В частности, в миоцитах АМР-зависимая киназа (АМРК) регулирует транспорт глюкозы, фосфорилируя другой набор остатков в AS160 [51–53].

В данной работе мы показали, что при моделировании клеточных патологий, характерных для ожирения, а именно дислипидемии, гипоксии и стресса ЭПР, в адипоцитах 3T3-L1 развивается длительная воспалительная реакция, выражающаяся в активации стресс-зависимых киназ JNK1/2, снижении активации инсулинового каскада и транспорта глюкозы в клетки. Напротив, моделирование острого воспаления с помощью ЛПС приводило к кратковременной активации JNK1/2, снижению активации инсули-



нового каскада, но не влияло на транспорт глюкозы в адипоциты. Полученные результаты указывают на связь инсулиновой резистентности с хроническим (латентным) воспалением, что делает воспаление перспективной мишенью для поиска новых терапевтических подходов к коррекции инсулиновой резистентности и сахарного диабета 2-го типа.

**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант

№ 14-35-00026) и Фонда поддержки научно-проектной деятельности студентов, аспирантов и молодых ученых «Национальное интеллектуальное развитие» (грант № 17-34-80026 «мол\_эв\_а»).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей и использованием животных в качестве объектов исследований.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. IDF Diabetes Atlas (2017) 8th edition, <http://diabetesatlas.org/resources/2017-atlas.html>.
2. Дедов И.И., Шестакова М.В., Викулова О.К., Железнякова А.В., Исаков М.А. (2018) Сахарный диабет в Российской Федерации: распространенность, заболеваемость, смертность, параметры углеводного обмена и структура сахароснижающей терапии по данным федерального регистра сахарного диабета, статус 2017 г., *Сахарный диабет*, **21**, 144–159, doi: 10.14341/DM9686.
3. Дедов И.И., Шестакова М.В., Петеркова В.А., Викулова О.К., Железнякова А.В., Исаков М.А., Лаптев Д.Н., Андрианова Е.А., Ширяева Т.Ю. (2017) Сахарный диабет у детей и подростков по данным Федерального регистра Российской Федерации: динамика основных эпидемиологических характеристик за 2013–2016 гг., *Сахарный диабет*, **20**, 392–402, doi: 10.14341/DM9460.
4. Wilcox, G. (2005) Insulin and insulin resistance, *Clin. Biochem. Rev.*, **26**, 19–39.
5. Esposito, D.L., Li, Y., Cama, A., and Quon, M.J. (2001) Tyr612 and Tyr632 in human insulin receptor substrate-1 are important for full activation of insulin-stimulated phosphatidylinositol 3-kinase activity and translocation of GLUT4 in adipose cells, *Endocrinology*, **142**, 2833–2840, doi: 10.1210/endo.142.7.8283.
6. Guertin, D.A., Stevens, D.M., Thoreen, C.C., Burds, A.A., Kalaany, N.Y., Moffat, J., Brown, M., Fitzgerald, K.J., and Sabatini, D.M. (2006) Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKC $\alpha$ , but not S6K1, *Dev. Cell*, **11**, 859–871, doi: 10.1016/j.devcel.2006.10.007.
7. Ткачук В.А., Воротников А.В. (2014) Молекулярные механизмы развития резистентности к инсулину, *Сахарный диабет*, **17**, 29–41, doi: 10.14341/DM2014229-40.
8. Boura-Halfon, S., and Zick, Y. (2009) Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **296**, E581–E591, doi: 10.1152/ajpendo.90437.2008.
9. Stafeev, I.S., Menshikov, M.Y., Tsokolaeva, Z.I., Shestakova, M.V., and Parfyonova, Ye.V. (2015) Molecular mechanisms of latent inflammation in metabolic syndrome. Possible role of sirtuins and peroxisome proliferator activated receptor type gamma, *Biochemistry (Moscow)*, **80**, 1217–1226, doi: 10.1134/S0006297915100028.
10. Trayhurn, P. (2013) Hypoxia and adipose tissue function and dysfunction in obesity, *Physiol. Rev.*, **93**, 1–21, doi: 10.1152/physrev.00017.2012.
11. Ozcan, U., Cao, Q., Yilmaz, E., Lee, A.H., Iwakoshi, N.N., Ozdelen, E., Tuncman, G., Gorgun, C., Glimcher, L.H., and Hotamisligil, G.S. (2004) Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes, *Science*, **306**, 457–461, doi: 10.1126/science.1103160.
12. Stafeev, I.S., Vorotnikov, A.V., Ratner, E.I., Menshikov, M.Y., and Parfyonova, Ye.V. (2017) Latent inflammation and insulin resistance in adipose tissue, *Int. J. Endocrinol.*, **2017**, 1–12, doi: 10.1155/2017/5076732.
13. Zick, Y. (2004) Uncoupling insulin signalling by serine/threonine phosphorylation: a molecular basis for insulin resistance, *Biochem. Soc. Trans.*, **32**, 812–816, doi: 10.1042/BST0320812.
14. Morino, K., Petersen, K.F., and Shulman, G.I. (2006) Molecular mechanisms of insulin resistance in humans and their potential links with mitochondrial dysfunction, *Diabetes*, **55**, S9–S15, doi: 10.2337/db06-S002.
15. Taniguchi, C.M., Emanuelli, B., and Kahn, C.R. (2006) Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **7**, 85–96, doi: 10.1038/nrm1837.
16. Hirosumi, J., Tuncman, G., Chang, L., Gorgun, C.Z., Uysal, K.T., Maeda, K., Karin, M., and Hotamisligil, G.S. (2002) A central role for JNK in obesity and insulin resistance, *Nature*, **420**, 333–336, doi: 10.1038/nature01137.
17. Arkan, M.C., Hevener, A.L., Greten, F.R., Maeda, S., Li, Z.W., Long, J.M., Wynshaw-Boris, A., Poli, G., Olefsky, J., and Karin, M. (2005) IKK- $\beta$  links inflammation to obesity-induced insulin resistance, *Nat. Med.*, **11**, 191–198, doi: 10.1038/nm1185.
18. Tuncman, G., Hirosumi, J., Solinas, G., Chang, L., Karin, M., and Hotamisligil, G.S. (2006) Functional *in vivo* interactions between JNK1 and JNK2 isoforms in obesity and insulin resistance, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 10741–10746, doi: 10.1073/pnas.0603509103.
19. Saltiel, A.R., and Olefsky, J.M. (2017) Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease, *J. Clin. Invest.*, **127**, 1–4, doi: 10.1172/JCI92035.
20. Donath, M.Y., and Shoelson, S.E. (2011) Type 2 diabetes as an inflammatory disease, *Nat. Rev. Immunol.*, **11**, 98–107, doi: 10.1038/nri2925.
21. Saltiel, A.R. (2016) Insulin signaling in the control of glucose and lipid homeostasis, *Handb. Exp. Pharmacol.*, **233**, 51–71, doi: 10.1007/164\_2015\_14.
22. Lackey, D.E., and Olefsky, J.M. (2016) Regulation of metabolism by the innate immune system, *Nat. Rev. Endocrinol.*, **12**, 15–28, doi: 10.1038/nrendo.2015.189.
23. Shimobayashi, M., Albert, V., Woelnerhanssen, B., Frei, I.C., Weissenberger, D., Meyer-Gerspach, A.C., Clement, N., Moes, S., Colombi, M., Meier, J.A., Swierczynska, M.M., Jenö, P., Beglinger, C., Peterli, R., and Hall, M.N. (2018)

- Insulin resistance causes inflammation in adipose tissue, *J. Clin. Invest.*, **128**, 1538–1550, doi: 10.1172/JCI196139.
24. Yuan, M., Konstantopoulos, N., Lee, J., Hansen, L., Li, Z.W., Karin, M., and Shoelson, S.E. (2001) Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikk $\beta$ . *Science*, **293**, 1673–1677, doi: 10.1126/science.1061620.
  25. Donath, M.Y. (2014) Targeting inflammation in the treatment of type 2 diabetes: time to start, *Nat. Rev. Drug. Disc.*, **13**, 465–476, doi: 10.1038/nrd4275.
  26. Stafeev, I.S., Michurina, S.S., Podkuychenko, N.V., Vorotnikov, A.V., Menshikov, M.Y., and Parfyonova, Ye.V. (2018) Interleukin-4 restores insulin sensitivity in lipid-induced insulin resistant adipocytes, *Biochemistry (Moscow)*, **83**, 498–506, doi: 10.1134/S0006297918050036.
  27. Zebisch, K., Voight, V., Wabitsch, M., and Brandsch, M. (2012) Protocol for effective differentiation of 3T3L1 cells to adipocytes, *Anal. Biochem.*, **425**, 88–90, doi: 10.1016/j.ab.2012.03.005.
  28. She, M., Hou, H., Wang, Z., Zhang, C., Laudon, M., and Yin, W. (2014) Melatonin rescues 3T3-L1 adipocytes from FFA-induced insulin resistance by inhibiting phosphorylation of IRS-1 on Ser307, *Biochimie*, **103**, 126–130, doi: 10.1016/j.biochi.2014.05.001.
  29. Svedberg, J., Bjorntorp, P., Smith, U., and Lonroth, P. (1990) Free-fatty acid inhibition of insulin binding, degradation, and action in isolated rat hepatocytes, *Diabetes*, **39**, 570–574, doi: 10.2337/diab.39.5.570.
  30. Citterio, C., Vichi, A., Pacheco-Rodriguez, G., Aponte, A.M., Moss, J., and Vaughan, M. (2008) Unfolded protein response and cell death after depletion of brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein GBF1, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 2877–2882, doi: 10.1073/pnas.0712224105.
  31. Glassford, A.J., Yue, P., Sheikh, A.Y., Chun, H.J., Zarafshar, S., Chan, D.A., Reaven, G.M., Quertermous, T., and Tsao, P.S. (2007) HIF-1 regulates hypoxia- and insulin-induced expression of apelin in adipocytes, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **293**, E1590–E1596, doi: 10.1152/ajpendo.00490.2007.
  32. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680–685, doi: 10.1038/227680a0.
  33. Sano, H., Kane, S., Sano, E., Miinea, C.P., Asara, J.M., Lane, W.S., Garner, C.C., and Lienhard, G.E. (2003) Insulin-stimulated phosphorylation of Rab GTPase-activating protein regulates GLUT4 translocation, *J. Biol. Chem.*, **278**, 14599–14602, doi: 10.1074/jbc.C300063200.
  34. Kane, S., Sano, H., Liu, S.C.H., Asara, J.M., Lane, W.S., Garner, C.C., and Lienhard, G.E. (2002) A method to identify serine kinases substrates. Akt phosphorylates a novel adipocyte protein with a Rab GTPase-activating protein (GAP) domain, *J. Biol. Chem.*, **277**, 22115–22118, doi: 10.1074/jbc.C200198200.
  35. Randle, P.J., Garland, P.B., Hales, C.N., and Newsholme, E.A. (1963) The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus, *Lancet*, **1**, 785–789, doi: 10.1016/S0140-6736(63)91500-9.
  36. Randle, P.J. (1998) Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: the glucose fatty acid cycle after 35 years, *Diabetes. Metab. Rev.*, **14**, 263–283.
  37. Cole, T.G., Patsch, W., Kuisk, I., Gonen, B., and Schonfeld, G. (1983) Increases in dietary cholesterol and fat raise levels of apoprotein E-containing lipoproteins in the plasma of man, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **56**, 1108–1115, doi: 10.1210/jcem-56-6-1108.
  38. Golay, A., and Bobbioni, E. (1997) The role of dietary fat in obesity, *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, **21**, S2–S11.
  39. Samuel, V.T., Petersen, K.F., and Shulman, G.I. (2010) Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism, *Lancet*, **375**, 2267–2277, doi: 10.1016/S0140-6736(10)60408-4.
  40. Shulman, G.I. (2014) Ectopic fat in insulin resistance, dyslipidemia, and cardiometabolic disease, *N. Engl. J. Med.*, **371**, 1131–1141, doi: 10.1056/NEJMra1011035.
  41. Oeckinghaus, A., Hayden, M.S., and Ghosh, S. (2011) Crosstalk in NF- $\kappa$ B signaling pathways, *Nat. Immunol.*, **12**, 695–708, doi: 10.1038/ni.2065.
  42. Lancaster, G.I., Langley, K.G., Berglund, N.A., Kam-moun, H.L., Reibe, S., Estevez, E., Weir, J., Mellett, N.A., Pernes, G., Conway, J.R.W., Lee, M.K.S., Timpson, P., Murphy, A.J., Masters, S.L., Gerondakis, S., Bartonicek, N., Kaczorowski, D.C., Dinger, M.E., Meikle, P.J., Bond, P.J., and Febbraio, M.A. (2018) Evidence that TLR4 is not a receptor for saturated fatty acids but mediates lipid-induced inflammation by reprogramming macrophage metabolism, *Cell. Metab.*, **27**, 1096–1110, doi: 10.1016/j.cmet.2018.03.014.
  43. Weidemann, A., and Johnson, R.S. (2008) Biology of HIF-1 $\alpha$ , *Cell. Death. Differ.*, **15**, 621–627, doi: 10.1038/cdd.2008.12.
  44. Greer, S.N., Metcalf, J.L., Wang, Y., and Ohh, M. (2012) The updated biology of hypoxia inducible factor, *EMBO J.*, **31**, 2448–2460, doi: 10.1038/emboj.2012.125.
  45. Melillo, G. (2011) Hypoxia: jump-starting inflammation, *Blood*, **117**, 2561–2562, doi: 10.1182/blood-2010-12-324913.
  46. Eltzschig, H.K., and Carmeliet, P. (2011) Hypoxia and inflammation, *N. Engl. J. Med.*, **364**, 656–665, doi: 10.1056/NEJMra0910283.
  47. Kamiya, T., Hara, H., Inagaki, N., and Adachi, T. (2010) The effect of hypoxia mimetic cobalt chloride on the expression of EC-SOD in 3T3-L1 adipocytes, *Redox Rep.*, **15**, 131–137, doi: 10.1179/174329210X12650506623483.
  48. Anadu, N.O., Davissou, V.J., and Cushman, M. (2006) Synthesis and anticancer activity of brefeldin A ester derivatives, *J. Med. Chem.*, **49**, 3897–3905, doi: 10.1021/jm0602817.
  49. Pahl, H.L., and Baeuerle, P.A. (1995) A novel signal transduction pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus is mediated by transcription factor NF- $\kappa$ B, *EMBO J.*, **14**, 2580–2588.
  50. Hotamisligil, G.S. (2006) Inflammation and metabolic disorders, *Nature*, **444**, 860–867, doi: 10.1038/nature05485.
  51. Treebak, J.T., Glund, S., Deshmukh, A., Klein, D.K., Long, Y.C., Jensen, T.E., Jorgensen, S.B., Viollet, B., Andersson, L., Neumann, D., Wallimann, T., Richter, E.A., Chibalin, A.V., Zierath, J.R., and Wojtaszewski, J.F. (2006) AMPK-mediated AS160 phosphorylation in skeletal muscle is dependent on AMPK catalytic and regulatory subunits, *Diabetes*, **55**, 2051–2058, doi: 10.2337/db06-0175.
  52. Kramer, H.F., Witczak, C.A., Fujii, N., Jessen, N., Taylor, E.B., Arnolds, D.E., Sakamoto, K., Hirshman, M.F., and Goodyear, L.J. (2006) Distinct signals regulate AS160 phosphorylation in response to insulin, AICAR, and contraction in mouse skeletal muscle, *Diabetes*, **55**, 2067–2076, doi: 10.2337/db06-0150.
  53. Treebak, J.T., Birk, J.B., Rose, A.J., Kiens, B., Richter, E.A., and Wojtaszewski, J.F. (2007) AS160 phosphorylation is associated with activation of  $\alpha_2\beta_2\gamma_1$ - but not  $\alpha_2\beta_2\gamma_3$ -AMPK trimeric complex in skeletal muscle during exercise in humans, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **292**, E715–E722, doi: 10.1152/ajpendo.00380.2006.

**CHEMICAL INDUCERS OF OBESITY-ASSOCIATED METABOLIC STRESS ACTIVATE INFLAMMATORY PATHWAYS REDUCING INSULIN SENSITIVITY IN 3T3-L1 ADIPOCYTES**

**I. S. Stafeev<sup>1,2\*</sup>, S. S. Michurina<sup>1,3</sup>, N. V. Podkuychenko<sup>1,3</sup>,  
M. Y. Menshikov<sup>1</sup>, Ye. V. Parfyonova<sup>1,2</sup>, and A. V. Vorotnikov<sup>1,4\*</sup>**

<sup>1</sup> *Institute of Experimental Cardiology, National Medical Research Centre for Cardiology, 121552 Moscow, Russia; E-mail: yuristafeev@gmail.com, a.vorotnikov@icloud.com*

<sup>2</sup> *Lomonosov Moscow State University, Faculty of Fundamental Medicine, 117192 Moscow, Russia*

<sup>3</sup> *Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, 119991 Moscow, Russia*

<sup>4</sup> *Lomonosov Moscow State University, Medical Center, 119991 Moscow, Russia*

Received October 8, 2018

Revised January 23, 2019

Accepted January 23, 2019

Obesity associated with dyslipidemia, inflammation, hypoxia, and endoplasmic reticulum (ER) stress is the major risk for insulin resistance and type 2 diabetes development. We modelled these conditions in cultured 3T3-L1 adipocytes to determine their effects on insulin signaling, glucose uptake, and inflammatory response using the value of activation of stress-dependent JNK1/2 kinases for quantitative assessment of effects. Under conditions of lipid (palmitate) overload of cells, acute lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation, Co<sup>2+</sup>-induced hypoxia, and brefeldin A-caused ER stress, we detected a decrease in insulin stimulation of IRS, Akt, and AS160 phosphorylation. In all these conditions except for acute inflammation, the insulin-dependent glucose uptake by adipocytes was reduced, and the activation kinetics of JNK1/2 was bi-phasic demonstrating an increased activity over 24 h. In contrast, in case of acute inflammation, the kinetics of JNK1/2 activation by LPS was transient, and the level of JNK phosphorylation returned to the basal level at 2–3 h of stimulation. These results suggest a critical role for sustained (latent) vs. transient (acute) inflammation in induction of adipose insulin resistance and glucose uptake impairment. Thus, inflammatory signaling cascade is a potential target for new therapeutic approaches to prevent insulin resistance and type 2 diabetes development.

*Keywords:* insulin resistance, type 2 diabetes, inflammation, glucose uptake, adipocytes