

УДК 577.17

## ПРЯМОЕ ДЕЙСТВИЕ СИНТЕТИЧЕСКОГО АНАЛОГА ГЛЮКАГОН-ПОДОБНОГО ПЕПТИДА 1-го ТИПА, ЛИРАГЛУТИДА, НА ЗРЕЛЫЕ АДИПОЦИТЫ РЕАЛИЗУЕТСЯ ЧЕРЕЗ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗА-ЗАВИСИМОЕ УСИЛЕНИЕ ИНСУЛИНОВОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ\*

© 2021 Е.Д. Мамонтова<sup>1,2,3</sup>, С.С. Мичурина<sup>1,2</sup>, Ю.С. Стафеев<sup>2\*\*</sup>, Е.Л. Соркина<sup>3</sup>,  
И.А. Склиник<sup>3</sup>, Е.О. Кокшарова<sup>3</sup>, М.Ю. Меньшиков<sup>2</sup>, М.В. Шестакова<sup>3</sup>, Е.В. Парфёнова<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,  
биологический факультет, 119234 Москва, Россия

<sup>2</sup> Институт экспериментальной кардиологии, НМИЦ кардиологии Минздрава России,  
121552 Москва, Россия; электронная почта: yuristafeev@gmail.com

<sup>3</sup> Институт диабета, НМИЦ эндокринологии Минздрава России, 117036 Москва, Россия

<sup>4</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,  
факультет фундаментальной медицины, 119234 Москва, Россия

Поступила в редакцию 02.11.2020

После доработки 07.12.2020

Принята к публикации 07.12.2020

Аналоги инкретиновых гормонов, в том числе глюкагон-подобного пептида 1-типа (ГПП-1), обладают сочетанным сахароснижающим, анорексигенным и кардиопротективным действиями. Механизмы действия ГПП-1 и его аналогов хорошо изучены для  $\beta$ -клеток поджелудочной железы, гепатоцитов и других типов тканей. Тем не менее эффекты ГПП-1 и его аналогов при локальном действии в жировой ткани в настоящий момент остаются неясными. В нашей работе мы провели оценку локального действия синтетического аналога ГПП-1, лираглутида, на адипогенную дифференцировку и инсулиновую чувствительность адипоцитов 3T3-L1. В ходе выполнения работы проводили белую и бежевую адипогенные дифференцировки преадипоцитов 3T3-L1 в течение 10 дней в присутствии/отсутствии 100 нМ лираглутида. Результат оценивали, определяя среднее число адипоцитов в поле зрения и поглощение экстракта красителя OilRedO. Затем в зрелых адипоцитах методом иммуноблоттинга оценивали зависимость активации и экспрессии киназ Erk и JNK от времени инкубации в присутствии лираглутида. Для уточнения механизма действия лираглутида зрелые адипоциты обрабатывали ингибитором аденилатциклазы SQ22536. В дальнейшем проводили оценку инсулиновой чувствительности клеток методами иммуноблоттинга и оценки инсулин-зависимого захвата глюкозы. В работе выявлено отсутствие значимого влияния лираглутида на бежевую адипогенную дифференцировку преадипоцитов 3T3-L1, при этом в составе белых адипоцитов лираглутид достоверно повышал экспрессию UCP-1. Исследование процессов активации промитогенной киназы Erk и провоспалительной киназы JNK при действии лираглутида продемонстрировало стимуляцию экспрессии киназы Erk и отсутствие эффектов на экспрессию киназы JNK. Добавление к клеткам одновременно с лираглутидом ингибитора аденилатциклазы SQ22536 вызывало подавление экспрессии Erk и активацию экспрессии JNK, что свидетельствует об участии аденилатциклазы в промитогенном и противовоспалительном эффектах лираглутида. Лираглутид стимулировал экспрессию субстрата инсулинового рецептора IRS-1 и киназы Akt, а также усиливал захват глюкозы клетками и экспрессию инсулин-зависимого глюкозного транспортера GLUT4; все эти эффекты нивелировались в присутствии SQ22536. В данной работе продемонстрировано усиление инсулиновой чувствительности зрелых адипоцитов синтетическим аналогом ГПП-1 лираглутидом, опосредуемое аденилатциклазой. Лираглутид не оказывал значимого воздействия на процесс бежевого адипогенеза, однако в составе белых адипоцитов усиливал экспрессию UCP-1. Полученные результаты свидетельствуют о позитивном инсулин-сенситизирующем прямом эффекте лираглутида на зрелые адипоциты, не связанном с формированием новых адипоцитов.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** инсулиновая резистентность, адипоцит, глюкагон-подобный пептид 1-го типа, инкретины.

**DOI:** 10.31857/S032097252103009X

Принятые сокращения: ГПП-1 – глюкагон-подобный пептид 1 типа; ИР – инсулиновая резистентность; СД2Т – сахарный диабет 2-го типа; цАМФ – циклический аденозинмонофосфат; CREB – белок, связывающий цАМФ-чувствительный элемент (cAMP responsive element binding protein); Erk – киназа, регулируемая внеклеточными стимулами (extracellular signal regulated kinase); GLUT4 – глюкозный транспортер 4-типа; IRS-1 – субстрат инсулинового рецептора типа 1; JNK – N-концевая киназа фактора c-Jun (c-Jun NH2-terminal kinase), N-концевая киназа фактора c-Jun; SQ22536 – ингибитор аденилатциклазы, UCP-1 – разобщающий белок 1-го типа (uncoupling protein type 1); PKA – протеинкиназа A (protein kinase A, cAMP-dependent protein kinase); PPARgamma – рецепторы, активируемые пероксисомными пролифераторами (peroxisome proliferator-activated receptor type gamma); RIPA – осаждающий буфер для радиоиммунного анализа (radioimmunoassay precipitation buffer).

\* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>, в рубрике «Papers in Press», ВМ20-312, 08.03.2021.

\*\* Адресат для корреспонденции.

## ВВЕДЕНИЕ

Ожирение является одним из наиболее распространенных заболеваний в мире, а также фактором риска развития инсулиновой резистентности (ИР) и сахарного диабета 2-го типа (СД2Т) [1–2] и связано, прежде всего, с увеличением объема жировой ткани. Ожирение и СД2Т увеличивают риск развития и тяжесть течения онкологических [3], сердечно-сосудистых [4] и многих других заболеваний. Изучение механизмов регуляции физиологии жировой ткани является важной научно-медицинской задачей.

Одной из наиболее новых и перспективных групп препаратов для коррекции СД2Т является группа глюкагон-подобного пептида 1-го типа (ГПП-1) и его аналогов. Физиологически, ГПП-1 представляет собой пептид, относящийся к семейству инкретиновых гормонов. Он образуется в результате ограниченного протеолиза проглюкагона в L-клетках тонкого кишечника [5]. Свободный ГПП-1 быстро деградирует в кровотоке под действием дипептидилпептидазы-4, время его полужизни составляет 1–2 минуты [6], поэтому в терапии СД2Т используют его синтетические аналоги. Лираглутид является синтетическим аналогом ГПП-1 и содержит несколько модификаций, которые не снижают его специфичность к рецептору глюкагон-подобного пептида 1-го типа. Увеличенное время полужизни лираглутида в крови составляет 13 часов [7].

ГПП-1 и препараты на основе других инкретиновых гормонов являются группой препаратов, для которых показано сочетание метаболического и кардиопротективного действия в терапии СД2Т. Существует мнение о том, что препараты на основе инкретиновых гормонов, в том числе аналоги ГПП-1, являются не столько антидиабетическими, сколько кардиопротективными препаратами с антидиабетическим эффектом [8–9]. ГПП-1 и его аналоги проявляют способность к снижению частоты развития сердечно-сосудистых и цереброваскулярных заболеваний, таких как ишемический инсульт, инфаркт миокарда и острый коронарный синдром [10]. Недавно также было показано, что ГПП-1 способствуют увеличению эндогенной антиоксидантной защиты, ингибированию апоптоза кардиомиоцитов, ослаблению эндотелиального воспаления и дисфункций [11].

Наиболее изученным механизмом действия ГПП-1 является влияние на  $\beta$ -клетки поджелудочной железы, проявляющееся в виде ГТФ-связывающего белок-зависимого экзоцитоза везикул инсулина, который происходит за счёт ак-

тивации аденилатциклазы и продукции циклического аденозинмонофосфата (цАМФ), активирующей кальциевую сигнализацию [12]. Несмотря на наличие существенных данных о системных эффектах ГПП-1 на поджелудочную железу, центральную нервную и сердечно-сосудистую системы [13–14], данных о механизмах действия ГПП-1 и его аналогов на жировую ткань существует немного. Также особый интерес вызывает то, что терапия с помощью лираглутида и аналогов ГПП-1 зачастую проводится путем введения препарата в подкожную жировую клетчатку, что вызывает интерес к локальному действию вводимого препарата как на процессы обновления, так и на процессы дифференцировки клеток-предшественников адипоцитов. Известно, что ГПП-1 воздействует на жировую ткань, способствуя захвату и запасанию глюкозы [15]. На данный момент существует два потенциальных механизма действия лираглутида на жировую ткань, которые достаточно сильно различаются. С одной стороны, ГПП-1 способствует активации как белой, так и бежевой адипогенных дифференцировок [16–17]. Другие данные демонстрируют способность ГПП-1 стимулировать активность аденилатциклазы и продукции цАМФ с дальнейшей активацией зависимого от протеинкиназы А (РКА) липолиза [18].

В нашей работе мы изучили действие синтетического аналога ГПП-1, лираглутида, на процессы формирования новых адипоцитов (оценка активности бежевой и белой адипогенных дифференцировок преадипоцитов 3T3-L1), на воспалительный статус зрелых адипоцитов (активность N-концевой киназы фактора c-Jun (JNK)), а также на инсулиновую чувствительность зрелых адипоцитов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Общий дизайн исследования.** Работу проводили на модели культивируемых преадипоцитов 3T3-L1. Для изучения процессов белой и бежевой адипогенной дифференцировки преадипоциты подвергали обработке соответствующими индукционными смесями в присутствии/отсутствии лираглутида. Для оценки эффективности дифференцировки вычисляли среднее число зрелых адипоцитов на единицу площади, проводили экстракцию сорбированного красителя OilRedO, измеряли уровень экспрессии белых/бежевых адипогенных маркеров с помощью иммуноблоттинга.

В дальнейшем проводили оценку кинетики фосфорилирования провоспалительной JNK и

промитогенной Erk (киназа, регулируемая внеклеточными стимулами) киназ при обработке зрелых адипоцитов лираглутидом в концентрации 100 нМ в течение 30 мин, 1, 6, 18 и 24 ч, а также в сочетании с ингибитором аденилатциклазы (SQ22536) в концентрации 500 мкМ с последующей оценкой инсулиновой чувствительности адипоцитов.

Для оценки инсулиновой чувствительности проводили обработку зрелых адипоцитов 3T3-L1 лираглутидом в течение 24 ч, после чего проводили оценку фосфорилирования и экспрессии основных участников инсулиновой сигнализации (субстрата инсулинового рецептора типа 1 (IRS-1) и киназы Akt) методом иммуноблоттинга, а также инсулин-стимулируемого захвата [<sup>3</sup>H]-2-дезоксиглюкозы.

**Материалы.** Для культивирования мышечных преадипоцитов 3T3-L1 («ATCC», США) использовали культуральную среду DMEM-F12 (концентрация глюкозы 4,5 г/литр) («Gibco», США), содержащую 10% эмбриональной бычьей сыворотки («HyClone», США) и 60 ед./мл смеси пенициллин/стрептомицин («Gibco», США). Преадипоциты 3T3-L1 дифференцировали с использованием инсулина, изобутилметилксантина, дексаметазона, розиглитазона, трийодтиронина и изопротеренола («Sigma Aldrich», США). Адипоциты инкубировали с синтетическим аналогом ГПП-1, лираглутидом («Selleckchem», Германия) и ингибитором аденилатциклазы, SQ22536 («Fluka», Germany). Для иммуноблоттинга использовали первичные антитела к pJNK1/2-T183/Y185 («R&D», США), tJNK1/2 («R&D», США), pErk1/2-T202/Y204 («Cell Signaling», США), tErk1/2 («Cell Signaling», США), UCP-1 («Thermo Scientific», США), PPARgamma («Cell Signaling», США), pIRS-Y612 («Thermo Scientific», США), tIRS («Cell Signaling», США), pAkt-S473 («Cell Signaling», США), tAkt («Abcam», США), GLUT4 («Abcam», США), beta-actin («Abcam», США) и вторичные антитела к IgG кролика/мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена («Abcam», США). Для оценки инсулин-индуцируемого захвата [<sup>3</sup>H]-2-дезоксиглюкозы использовали растворы 2-дезоксиглюкозы («Sigma Aldrich», США) и [<sup>3</sup>H]-2-дезоксиглюкозы («Perkin Elmer», США). Клеточный лизат образца растворяли в сцинтилляционной жидкости UltimaGold («Perkin Elmer», США), и измеряли количества распадов в образце на счётчике LKB RackBeta («LKB», Швеция). Для измерения концентрации белка использовали набор реактивов с использованием бицинхониновой кислоты «Pierce BCA Protein Assay Kit» («Thermo Scientific», США).

**Культивирование и дифференцировка преадипоцитов 3T3-L1.** Преадипоциты клеточной линии 3T3-L1 культивировали в среде DMEM-F12 (4,5 г/литр глюкозы), содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки (FBS) и 60 ед./литр смеси пенициллин/стрептомицин.

Белую адипогенную дифференцировку проводили по протоколу Zebisch et al. [19] с изменениями. Клетки культивировали до конfluence ~100%, держали в плотном конfluence в течение 2 дней, после чего следующие 4 дня среду заменяли на среду DMEM, содержащую 10% FBS, 0,5 мМ дексаметазона, 0,25 мкМ изобутилметилксантина, 2 мкМ розиглитазона, 100 нМ инсулина. Затем среду заменяли на стандартную среду культивирования на 2–4 дня и использовали культуру адипоцитов для экспериментов. Для оценки уровня накопления липидов использовали окраску липофильным красителем OilRedO («Merck Millipore», Германия). Результат окрашивания снимали в 4-х случайных полях зрения на микроскопе AxioVertA1 («Zeiss», Германия) в режиме фазово-контрастной микроскопии с последующим вычислением числа зрелых адипоцитов на единицу площади. Экстракцию красителя OilRedO из окрашенных адипоцитов проводили с использованием 100% изопропанола, поглощение экстракта оценивали на планшетном спектрофотометре Multiscan Microplate Reader («Labsystems», США).

Бежевую адипогенную дифференцировку проводили по протоколу Miller et al. [20] с изменениями. Клетки культивировали до конfluence ~100%, держали в плотном конfluence в течение 2 дней, после чего следующие 4 дня среду заменяли на среду DMEM, содержащую 10% FBS, 0,5 мМ дексаметазона, 0,25 мкМ изобутилметилксантина, 2 мкМ розиглитазона, 100 нМ инсулина, 1 нМ трийодтиронина и 100 мкМ изопротеренола. Затем среду заменяли на стандартную среду культивирования на 2–4 дня и использовали культуру адипоцитов для экспериментов.

**Оценка уровня фосфорилирования основных участников инсулиновой сигнализации зрелых адипоцитов 3T3-L1.** Для оценки уровня фосфорилирования основных участников инсулиновой сигнализации проводили депривацию зрелых адипоцитов в течение 4 ч в бессывороточной среде DMEM-F12. Затем обрабатывали клетки 100 нМ инсулина в течение 20 мин, после чего лизировали клетки в осаждающем буфере для радиоиммунного анализа (RIPA) (150 мМ NaCl, 1% (w/v) Triton-X100, 0,5% дезоксихолата натрия, 0,1% додецилсульфата натрия, 50 мМ Tris-HCl при pH 8,0) с ингибиторами протеаз и фосфатаз («Roche», Швеция). Клеточные лиза-



ты гомогенизировали инсулиновым шприцем с диаметром иглы 29G.

**Инсулин-индуцируемый захват [ $^3\text{H}$ ]-2-дезоксиглюкозы.** Для оценки инсулин-индуцируемого захвата глюкозы зрелые адипоциты 3T3-L1 стимулировали инсулином в концентрации 100 нМ в течение 20 минут, после чего в среду добавляли раствор, содержащий 100 мкМ 2-дезоксиглюкозы и 0,5 мкКи [ $^3\text{H}$ ]-2-дезоксиглюкозы, на 5 мин. Клетки трижды отмывали холодным фосфатно-солевым буфером и лизировали их с помощью буфера RIPA. Клеточный лизат растворяли в сцинтилляционной жидкости и измеряли количество распадов в образце на счетчике  $\beta$ -излучения.

**Изучение действия лираглутида на активность промитогенных и провоспалительных киназ Erk и JNK.** В дальнейшей работе проводили измерение зависимости уровней фосфорилирования и экспрессии промитогенной киназы Erk и провоспалительной киназы JNK от времени инкубации в присутствии 100 нМ лираглутида. Зрелые адипоциты 3T3-L1 депривировали в бессывороточной среде DMEM-F12 в течение 4 ч, после чего стимулировали лираглутидом в течение 30 мин, 1, 6, 18 и 24 ч. После стимуляции проводили лизис клеток в буфере RIPA с последующим анализом методом иммуноблоттинга. Для изучения механизма экспрессионных эффектов лираглутида на зрелые адипоциты 3T3-L1 проводили инкубацию в присутствии ингибитора аденилатциклазы SQ22536. Перед экспериментом также проводили депривацию клеток, как описано выше, с последующим добавлением вместе с лираглутидом ингибитора аденилатциклазы SQ22536 до концентрации 500 мкМ.

**Иммуноблоттинг.** Клеточные лизаты разделяли с помощью электрофореза в денатурирующих условиях по методу Лэммли в 10%-ном полиакриламидном геле [21]. Электроперенос белков проводили на поливинилиденфторидные мембраны («Amersham», США) методом мокрого переноса согласно инструкции производителя. Мембраны блокировали в течение 6 ч в 50 мМ Tris-HCl при pH 8,0, содержащем 5% обезжиренного молока («Applichem», Германия) с добавлением 0,1% (v/v) Tween 20, после чего инкубировали с первичными антителами согласно инструкции производителя. В дальнейшем мембраны обрабатывали вторичными антителами согласно инструкции производителя. Визуализацию хемилюминесценции осуществляли с использованием набора реактивов Clarity ECL («Bio-Rad», США) и регистрировали сигнал с помощью гель-документирующей системы FusionX («Vilber-Lourmat», Франция). Полученные изображения обрабатывали с помощью

программ ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>) и GelAnalyzer (<http://www.gelanalyzer.com/>). В дальнейшем вычисляли значение отношения фосфорилированной формы белка к общему количеству этого белка либо нормировали общее количество белка на белок эндогенного контроля  $\beta$ -актин.

**Статистический анализ.** Данные представлены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение. Для каждой экспериментальной точки выполняли три независимых клеточных повтора, каждый из которых анализировали в трех репликатах. Для расчёта достоверности различий использовали  $t$ -критерий Стьюдента, принимая достоверными различия с вероятностью  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Лираглутид не оказывает значимого влияния на бежевую дифференцировку, однако способствует росту экспрессии UCP-1 при белой дифференцировке преадипоцитов 3T3-L1.** На первом этапе работы мы оценили воздействие синтетического аналога ГПП-1 лираглутида на процессы белой и бежевой адипогенных дифференцировок. Постановка данной задачи связана с подкожным введением лираглутида в клинической практике и возможным локальным действием лираглутида на адипогенез в составе жировой ткани. Эксперименты проводили в присутствии лираглутида в концентрации 100 нМ в индукционных смесях и средах культивирования после индукции (см. раздел «Материалы и Методы»).

Для оценки уровня дифференцировки преадипоцитов 3T3-L1 проводили окрашивание клеток после дифференцировки в присутствии/отсутствии лираглутида липофильным красителем OilRedO (рис. 1, а). Подсчет числа зрелых адипоцитов на единицу площади не продемонстрировал статистически значимых отличий между группами, однако при обработке белых и бежевых адипоцитов лираглутидом наблюдали статистически недостоверную тенденцию к увеличению числа адипоцитов в группах, подвергнутых обработке лираглутидом (рис. 1, б). Аналогичную ситуацию наблюдали и при оценке поглощения экстрактов красителя OilRedO — при обработке адипоцитов лираглутидом наблюдали небольшую тенденцию к росту поглощения экстрактов, в случае белой адипогенной дифференцировки эта разница была достоверна ( $p = 0,004$ ), однако прирост поглощения после обработки лираглутидом составил менее 10% от общего значения (рис. 1, в). Полученные результаты ставят под сомнение нали-



тах 3T3-L1 после белой адипогенной дифференцировки.

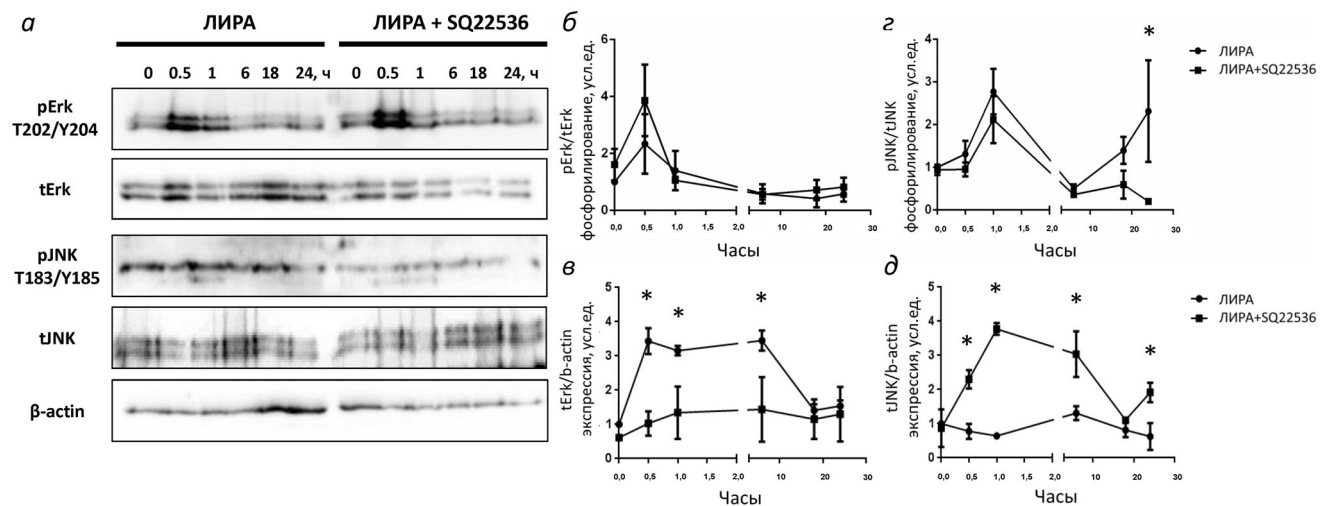
**Лираглутид усиливает экспрессию промитогенной киназы Erk и подавляет экспрессию провоспалительной киназы JNK за счёт активации аденилатциклазы.** В ходе дальнейшей работы проводили оценку действия лираглутида на активацию и экспрессию промитогенной (Erk) и провоспалительной (JNK) киназ в зависимости от времени воздействия в зрелых белых адипоцитах 3T3-L1.

Анализ кинетики уровня фосфорилирования киназ Erk и JNK (рис. 2, а, б и в) продемонстрировал сходную картину транзитной активации (фосфорилирование Erk –  $p = 0,04$  в интервале времени 0–0,5 ч;  $p = 0,117$  в интервале времени 0,5–1 ч; и  $p = 0,04$  в интервале времени 1–6 ч; в присутствии ингибитора аденилатциклазы (SQ22536) характер достоверности различий не изменялся). Анализ кинетики экспрессии киназы Erk продемонстрировал довольно сильную активацию экспрессии в ответ на действие лираглутида. Данный эффект наблюдался, начиная с 0,5 ч инкубации в присутствии лираглутида, что довольно мало для реализации экспрессионных эффектов. Тем не менее уровень экспрессии киназы Erk был статистически достоверно повышен в течение 6 ч инкубации в присутствии лираглутида, однако в интервале 18–24 ч уровень экспрессии киназы Erk вернулся к базовому значению (рис. 2, а и в). Экспрес-

сия киназы JNK достоверно не изменялась относительно контроля с течением времени в присутствии лираглутида (рис. 2, а и д). Таким образом, лираглутид обладает способностью к транзитной активации киназ Erk и JNK, которая сопровождается достаточно стабильным (до 6 ч) ростом экспрессии киназы Erk. В связи с этим мы предположили наличие разнонаправленных экспрессионных эффектов лираглутида на зрелые адипоциты 3T3-L1.

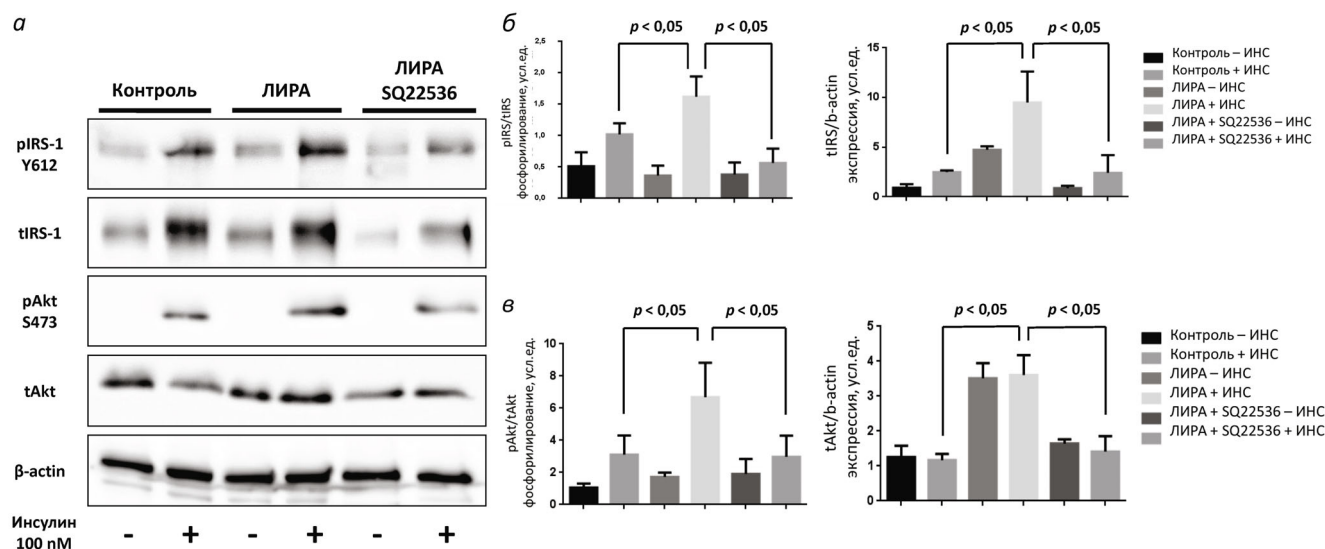
Основным транскрипционным фактором, задействованным в экспрессионных эффектах лираглутида, является фактор CREB (белок, связывающий цАМФ-чувствительный элемент), который активируется при повышении концентрации цАМФ в клетке [22–24]. Основным ферментом, производящим цАМФ в клетке и, кроме того, способным активировать транскрипционный фактор CREB, является аденилатциклаза. В дальнейшей работе для проверки механизма действия лираглутида использовали ингибитор аденилатциклазы (SQ22536) до концентрации 500 мкМ [25–27].

Анализ кинетики уровня фосфорилирования киназ Erk и JNK под действием лираглутида в присутствии SQ22536 продемонстрировал аналогичный транзитный ответ. В случае JNK мы наблюдаем рост активационного фосфорилирования киназы в точке 24 ч относительно того же уровня в присутствии SQ22536 (рис. 2, а, б и в). SQ22536 полностью подавлял активацию



**Рис. 2.** Лираглутид не оказывает значимого влияния на активацию сигнализации киназ Erk и JNK, однако влияет на их экспрессию через аденилатциклазу. а – Репрезентативные иммуноблоттинги; б – зависимость уровня фосфорилирования киназ pErk1/2-T202/Y204 от времени действия лираглутида; в – зависимость уровня экспрессии киназ Erk1/2 от времени действия лираглутида; г – зависимость уровня фосфорилирования киназ pJNK1/2-T183/Y185 от времени действия лираглутида; д – зависимость уровня экспрессии киназ tJNK1/2 от времени действия лираглутида. Все данные получены при использовании 100 нМ лираглутида ± 500 мкМ SQ22536. Представлены результаты трех независимых экспериментов, для расчёта достоверности различий использовали *t*-критерий Стьюдента, \* $p < 0,05$ , статистическая значимость рассчитана для каждой пары значений в одной временной точке (± 500 мкМ SQ22536)





**Рис. 3.** Лираглутид усиливает фосфорилирование и экспрессию белков IRS-1 и Akt путём активации аденилатциклазы. Все данные представлены в присутствии 100 нМ лираглутида  $\pm$  500 мкМ SQ22536. **а** – Репрезентативные иммуноблоттинги, **б** – результаты статистического анализа активации и экспрессии IRS-1, **в** – результаты статистического анализа активации и экспрессии Akt. В расчётах представлены результаты трех независимых экспериментов, для расчёта достоверности различий использовали *t*-критерий Стьюдента, результат считался статистически недостоверным при  $p > 0,05$

экспрессии Erk лираглутидом при инкубации 0,5–6 ч. И, если лираглутид сам по себе не влиял на экспрессию JNK, в присутствии SQ22536 наблюдалась статистически достоверная активация экспрессии JNK (рис. 2, **а**, **в** и **д**). Данный результат указывает на разнонаправленную регуляцию экспрессии Erk и JNK, которая зависит от цАМФ, лираглутидом. Это позволяет предполагать возможность участия лираглутида в регуляции процессов пролиферации и воспаления клеток в составе жировой ткани.

**Лираглутид усиливает фосфорилирование и экспрессию белков IRS-1 и Akt за счёт активации аденилатциклазы.** Мы предположили, что, помимо регуляции процессов пролиферации и воспаления в жировой ткани, лираглутид может оказывать системное сахароснижающее действие за счёт повышения инсулиновой чувствительности адипоцитов при подкожном введении препарата.

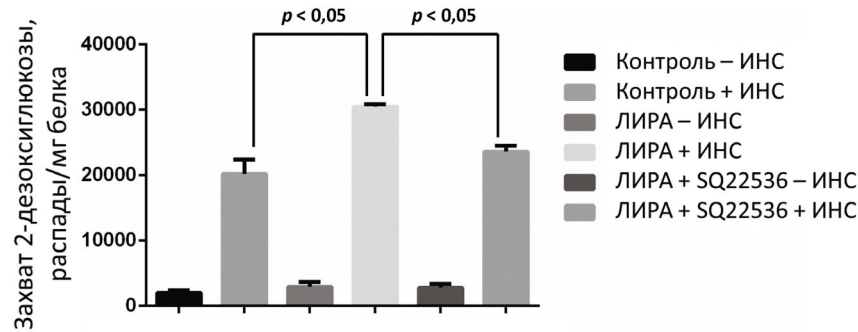
В ходе работы была показана стимуляция как фосфорилирования, так и экспрессии каркасного белка IRS-1, который способствует передаче сигнала инсулина от рецептора к внутриклеточным киназам (рис. 3, **а** и **б**), а также киназы Akt при прямом действии лираглутида на зрелые адипоциты (рис. 3, **а** и **в**). Стоит отметить, что уровень базального фосфорилирования протеинкиназы Akt при действии лираглутида практически не изменяется, что в сочетании с усилением экспрессии Akt при действии лираглутида может свидетельствовать об умень-

шении степени фосфорилирования Akt при действии лираглутида без стимуляции инсулином (рис. 3, **а** и **в**). SQ22536 способствует полному исчезновению эффектов лираглутида и возврату значений уровня фосфорилирования и экспрессии белков IRS-1 и Akt к базальным показателям (рис. 3, **а** и **б**). Полученные результаты демонстрируют стимулирующее действие лираглутида на работу инсулин-зависимой сигнализации, что позволяет предполагать ассоциированные изменения в процессе инсулин-зависимого захвата глюкозы.

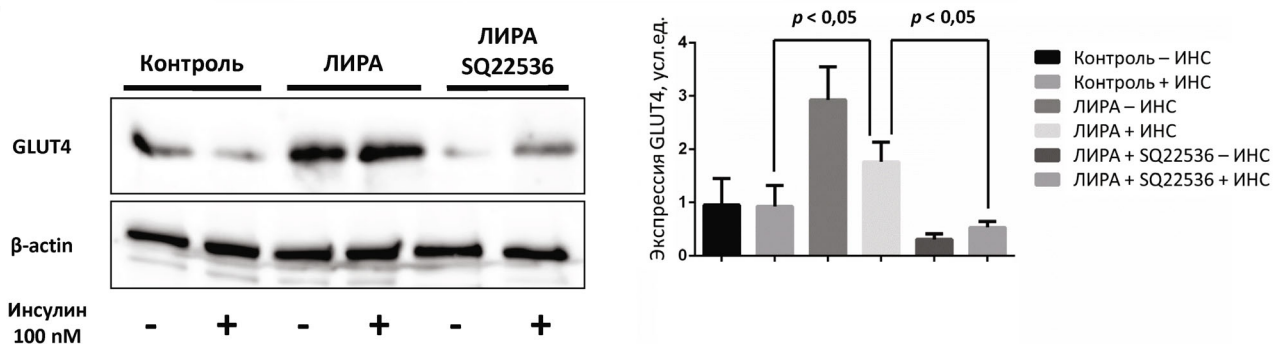
**Лираглутид усиливает инсулин-стимулируемый захват глюкозы зрелыми адипоцитами 3T3-L1 по аденилатциклаза-зависимому механизму.** После оценки активности инсулиновой сигнализации мы перешли к изучению физиологического ответа зрелых адипоцитов 3T3-L1 на действие инсулина. Реальным физиологическим ответом адипоцитов на инсулин является скорость поглощения глюкозы.

В зрелых адипоцитах 3T3-L1 инсулин стимулирует захват глюкозы адипоцитами примерно в 9,5 раз относительно контроля, в то время как в присутствии лираглутида стимуляция увеличивается (до 11 раз). Стоит отметить, что в абсолютных значениях захват глюкозы при действии инсулина в присутствии лираглутида увеличивается на 30% относительно аналогичного показателя в отсутствие лираглутида ( $p = 0,023$ , рис. 4, **а**). Добавление SQ22536 полностью снимает эффект лираглутида ( $p = 0,01$ ,

а



б



**Рис. 4.** Лираглутид усиливает инсулин-зависимый захват глюкозы путём регуляции экспрессии инсулин-зависимого транспортера глюкозы GLUT4 при участии аденилатциклазы. Все данные представлены в присутствии 100 нМ лираглутида  $\pm$  500 мкМ SQ22536. *а* – Гистограмма инсулин-стимулируемого захвата [3H]-2-дезоксиглюкозы, *б* – репрезентативный иммуноблоттинг и гистограмма денситометрии иммуноблоттинга. В расчётах представлены результаты трех независимых экспериментов, для расчёта достоверности различий использовали *t*-критерий Стьюдента, результат считался статистически недостоверным при  $p > 0,05$

рис. 4, *а*), при этом в абсолютных значениях захват глюкозы при действии инсулина в контроле и в присутствии лираглутида с SQ22536 статистически не различаются (рис. 4, *а*). В качестве выяснения возможных механизмов усиления инсулиновой чувствительности адипоцитов при действии лираглутида в ходе работы проводили оценку экспрессии инсулин-зависимого транспортера глюкозы 4-го типа (GLUT4). Было показано существенное усиление экспрессии GLUT4 при действии лираглутида, при этом эффект лираглутида на экспрессию GLUT4 полностью нивелировался в присутствии SQ22536 (рис. 4, *б*). Стоит отметить, что в присутствии лираглутида добавление к клеткам инсулина снижает экспрессию GLUT4 относительно не стимулированных инсулином клеток, но не относительно контрольных клеток или действия ингибитора. Данный факт может быть связан с чрезвычайно плеiotропным действием лираглутида на адипоциты. Суммируя полученные результаты, мы можем предположить, что лираглутид способствует улучшению инсулиновой чувствительности адипоцитов, причем данные

эффекты реализуются по аденилатциклаза-зависимому механизму.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

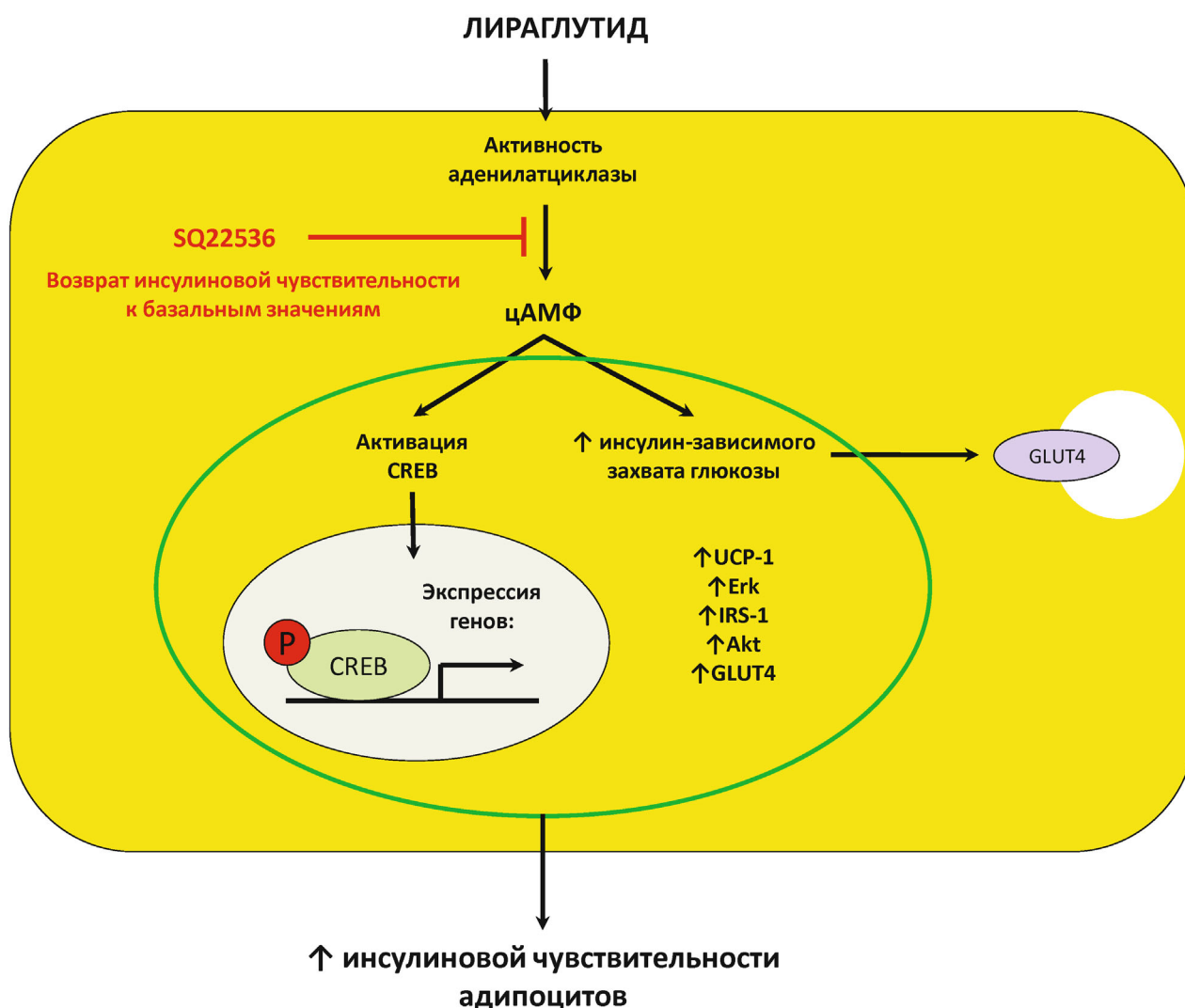
В данной работе мы продемонстрировали эффекты, связанные с прямым действием синтетического аналога ГПП-1 лираглутида на преадипоциты и зрелые адипоциты 3T3-L1. В концентрации 100 нМ лираглутид существенно не изменял способность преадипоцитов к адипогенной дифференцировке, усиливая, однако, экспрессию UCP-1 в белых адипоцитах и коммитируя их в направлении бежевой дифференцировки. Лираглутид способен разнонаправленно регулировать экспрессию промитогенной киназы Erk и провоспалительной киназы JNK в зрелых адипоцитах по аденилатциклаза-зависимому механизму. Также лираглутид продемонстрировал потенциал к усилению экспрессии ряда участников инсулиновой сигнализации и инсулин-зависимого транспортера глюкозы GLUT4 по аденилатциклаза-зависимому меха-



низму. Лираглутид стимулирует инсулин-зависимый захват глюкозы, причем это также происходит при участии аденилатциклазы (рис. 5).

Основная функция ГПП-1 заключается в реализации инсулинотропного эффекта в ответ на приём пищи – при действии ГПП-1 происходит стимуляция секреции инсулина, а также подавление секреции глюкагона через активацию специфического рецептора ГПП-1. Инсулинотропный эффект в сочетании с другими быстрыми эффектами ГПП-1 способствует снижению уровня глюкозы крови [28–30]. Таким образом, можно заключить, что ГПП-1 является «усилителем», который дополнительно стимулирует

постпрандиальную секрецию инсулина, вызывая максимальную активацию захвата глюкозы клетками. Тем не менее у пациентов с ИР и СД2Т наблюдается снижение ГПП-1 и общее изменение профиля секреции инкретиновых гормонов [31–33]. Именно поэтому разработка терапевтического подхода к коррекции ИР и СД2Т на основе использования аналогов ГПП-1 и других инкретиновых гормонов получила такое развитие в начале XXI века [34–35]. В настоящее время наиболее распространенными препаратами на основе аналогов ГПП-1 являются препараты на основе лираглутида – синтетического аналога ГПП-1. Введение большинства препаратов на



**Рис. 5.** Возможный механизм прямого действия лираглутида на зрелые адипоциты связан с регуляцией активности аденилатциклазы, которая через активацию транскрипционного фактора CREB способна оказывать эффекты на экспрессию важнейших участников процессов термогенеза (UCP-1), воспаления (JNK), пролиферации и выживаемости (Erk), а также инсулиновой чувствительности (IRS-1, Akt и GLUT4). Сокращения и аббревиатуры: Akt – протеинкиназа B; cAMP – цАМФ; CREB – белок, связывающий цАМФ-чувствительный элемент; Erk – киназа, регулируемая внеклеточными стимулами; GLUT4 – транспортер глюкозы 4-го типа; IRS – субстрат инсулинового рецептора; JNK – N-концевая киназа фактора c-Jun; SQ22536 – ингибитор аденилатциклазы; UCP-1 – разобщающий белок 1-го типа

основе аналогов ГПП-1 происходит в подкожную жировую клетчатку, регуляция образования которой является важнейшей проблемой в контексте вопросов ожирения и СД2Т.

В настоящее время вопрос взаимодействия ГПП-1 и жировой ткани хорошо изучен с точки зрения центральных механизмов регуляции. ГПП-1 способен модулировать активность гипоталамо-гипофизарной системы и влиять на метаболизм жировой ткани, стимулируя биогенез бежевого жира [36–38]. Тем не менее в одном из последних исследований механизмов эффективности бариатрической хирургии была показана роль именно локальной экспрессии рецептора ГПП-1 в подкожной жировой ткани в процессе улучшения метаболических параметров пациентов с ожирением и СД2Т после бариатрических хирургических вмешательств [39]. Таким образом, можно предполагать, что локальное действие ГПП-1 и его аналогов способно улучшать метаболический профиль и инсулиновую чувствительность. В нашей работе мы попытались прояснить механизмы локального действия ГПП-1 (в лице его синтетического аналога лираглутида) на процессы белой и бежевой адипогенной дифференцировки.

Первой нашей находкой было отсутствие очевидного эффекта лираглутида на процессы белой адипогенной дифференцировки, что сочеталось с усилением экспрессии UCP-1 в составе белых адипоцитов под действием лираглутида. Ранее не было продемонстрировано убедительного локального эффекта ГПП-1 на активацию бежевой адипогенной дифференцировки, поэтому наши результаты в этой области являются новыми. Известно, что ключевым фактором в регуляции биогенеза бежевой жировой ткани при системном действии лираглутида является ответ гипоталамо-гипофизарной системы, который способен регулировать термогенез [36–38]. Тем не менее некоторые работы показывают активацию белой адипогенной дифференцировки преадипоцитов 3T3-L1 в ответ на действие лираглутида и ГПП-1 [16–17]. Стоит отметить тот факт, что данные работы выполнены в несколько иной модели адипогенной дифференцировки, которая не включает в себя использование розиглитазона. Использование розиглитазона способствует сильной индукции адипогенной дифференцировки и может нивелировать возможный эффект лираглутида на белый адипогенез. В рамках обсуждения отсутствия эффекта лираглутида на экспрессию UCP-1 в условиях бежевой адипогенной дифференцировки можно предположить максимальный эффект индукционной среды для бежевых адипоцитов в повышении экспрессии UCP-1, и

наблюдаемый уровень экспрессии является максимальным для данных условий.

Переходя к обсуждению экспрессионных эффектов локального действия лираглутида на киназы Erk и JNK (рис. 5), стоит отметить возможное локальное промитогенное и защитное (pro-survival) действие (Erk) и противовоспалительное действие (JNK) лираглутида. Действительно, в некоторых работах отмечается промитогенное действие лираглутида и ГПП-1 через активацию киназы Erk, данный эффект прослежен на различных типах клеток [40–41]. Существуют данные и о противовоспалительном действии лираглутида и ГПП-1, однако эти данные получены на животных моделях. Было продемонстрировано, что нативный ГПП-1 при гиперэкспрессии в жировой ткани снижает степень ожирения и инфильтрации жировой ткани макрофагами, а также способствует противовоспалительной поляризации макрофагов [42–43]. Однако стоит понимать, что в данных работах речь идет скорее о системном действии лираглутида, первые данные о локальном противовоспалительном действии получены в нашей работе.

Несмотря на многие факты, указывающие на центральное действие ГПП-1 и его аналогов как на основной механизм регуляции гомеостаза жировой ткани, в нашей работе был отмечен очень существенный момент относительно прямого действия ГПП-1 на адипоциты. Лираглутид способен существенно активировать экспрессию участников инсулинового каскада и способствовать поглощению глюкозы подкожной жировой тканью. Данные результаты согласуются с работой Gao et al. [44], где была продемонстрирована регуляция инсулиновой сигнализации адипоцитов с помощью ГПП-1 через экспрессионные эффекты на инсулиновый рецептор, IRS-1 и инсулин-зависимый глюкозный транспортер GLUT4, однако находки, связанные с изменением инсулин-стимулированного захвата глюкозы, экспрессии GLUT4 и аденилатциклаза-зависимым характером данных изменений являются новыми.

В работе убедительно показан рост инсулин-зависимого поглощения глюкозы при прямом действии лираглутида на зрелые адипоциты 3T3-L1. Интересен вопрос о дальнейшей судьбе данной глюкозы. Согласно нашим результатам, глюкоза не трансформировалась напрямую в запасную форму энергии (в липиды), так как ни количество адипоцитов, ни суммарное содержание в них липидов не изменились (рис. 1, а–в). Возможным ответом может являться обнаруженный рост экспрессии UCP-1 – разобщающего белка митохондрий и основного участника процесса термогенеза, который способен сжи-

гать энергетические запасы клетки. Можно предположить, что повышение инсулин-зависимого поглощения глюкозы зрелыми адипоцитами 3T3-L1 в присутствии лираглутида связано с активацией процессов термогенеза и сжигания нутриентов под действием лираглутида.

Механизмы экспрессионных эффектов лираглутида на жировую ткань были исследованы в предыдущих работах, однако консенсусного мнения по данному вопросу в настоящее время не существует. Безусловно, центральным эффектором регуляции экспрессии в поджелудочной железе является транскрипционный фактор CREB [22–24]. В предыдущих работах был продемонстрирован трехкратный рост концентрации цАМФ в адипоцитах под влиянием ГПП-1, что косвенно подтверждает цАМФ-зависимый механизм действия ГПП-1 на адипоциты [18]. Также было продемонстрировано, что добавление ингибитора цАМФ-зависимой протеинкиназы (PKA) блокирует ГПП-1-стимулируемые изменения экспрессии синтазы жирных кислот и активацию транскрипционного фактора CREB в составе зрелых адипоцитов 3T3-L1 [17]. Однако стоит отметить, что транскрипционный фактор CREB может работать не только как гомодимер, но и образуя активный гомодимер с транскрипционными факторами ATF, поэтому стоит понимать возможную вовлеченность других транскрипционных факторов семейства CREB/ATF в реализацию физиологических эффектов лираглутида [45]. Полученные нами данные о аденилатциклаза-зависимых экспрессионных эффектах лираглутида подтверждают участие аденилатциклаза-зависимого PKA-CREB сигнального каскада в реализации экспрессионных эффектов лираглутида при локальном действии на подкожную жировую ткань.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Суммируя результаты проделанной работы, следует отметить, что синтетический аналог ГПП-1 лираглутид оказывает позитивное прямое действие на зрелые адипоциты, стимулируя их инсулиновую чувствительность, а также обладая промитогенным и противовоспалительным действиями. Данные эффекты реализуются через аденилатциклазу и, по-видимому, через PKA–CREB сигнальный каскад. Синтетический аналог ГПП-1, лираглутид, не демонстрирует существенного прямого действия как на биогенез термогенных адипоцитов, так и на процесс биогенеза белых адипоцитов. Полученные результаты свидетельствуют о позитивном антидиабетическом локальном эффекте лираглутида, однако механизмы регуляции термогенеза и запасания липидов, по-видимому, реализуются в большей степени через системное действие лираглутида.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (проект № 19-75-00068), а также в рамках совместного Российско-Тайваньского проекта Российского Научного Фонда и Министерства науки и технологий Тайваня (проект № 20-45-08003).

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Olefsky, J. M., and Glass, C. K. (2010) Macrophages, inflammation, and insulin resistance, *Annu. Rev. Physiol.*, **72**, 219–246.
2. Vorotnikov, A. V., Stafeev, I. S., Menshikov, M. Yu., Shestakova, M. V., and Parfyonova, Ye. V. (2019) Latent inflammation and defect in adipocyte renewal as a mechanism of obesity-associated insulin resistance, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 1329–1345.
3. Gallagher, E. J., and LeRoith, D. (2015) Obesity and diabetes: the increased risk of cancer and cancer-related mortality, *Physiol. Rev.*, **95**, 727–748.
4. Booth, G. L., Kapral, M. K., Fung, K., and Tu, J. V. (2006) Recent trends in cardiovascular complications among men and women with and without diabetes, *Diabetes Care*, **29**, 32–37.
5. Mojsov, S., Weir, G. C., and Habener, J. F. (1987) Insulinotropin: glucagon-like peptide I (7–37) co-encoded in the glucagon gene is a potent stimulator of insulin release in the perfused rat pancreas, *J. Clin. Invest.*, **79**, 616–619.
6. Deacon, C. F., Nauck, M. A., Toft-Nielsen, M., Pridal, L., Willms, B., and Holst, J. J. (1995) Both subcutaneously and intravenously administered glucagon-like peptide 1 are rapidly degraded from the NH<sub>2</sub>-terminus in type II diabetic patients and in healthy subjects, *Diabetes*, **44**, 1126–1131.
7. Jackson, S. H., Martin, T. S., Jones, J. D., Seal, D., and Emanuel, F. (2010) Liraglutide (victoza): the first once-daily incretin mimetic injection for type 2 diabetes, *P T*, **35**, 498–529.
8. Chou, C. Y., Chang, Y. T., Yang, J. L., Wang, J. Y., Lee, T. E., et al. (2017) Effect of long-term incretin-based therapies on ischemic heart diseases in patients with type 2 diabetes mellitus: a network meta-analysis, *Sci. Rep.*, **7**, 15795.
9. Nathanson, D., Ullman, B., Löfström, U., Hedman, A., Frick, M., et al. (2012) Effects of intravenous exenatide in type 2 diabetic patients with congestive heart failure: a double-blind, randomised controlled clinical trial of efficacy and safety, *Diabetologia*, **55**, 926–35.



10. White, W. B., and Baker, W. L. (2016) Cardiovascular effects of incretin-based therapies, *Annu. Rev. Med.*, **67**, 245-60.
11. Erdogdu, O., Nathanson, D., Sjöholm, A., Nyström, T., and Zhang, Q. (2010) Exendin-4 stimulates proliferation of human coronary artery endothelial cells through eNOS-, PKA- and PI3K/Akt-dependent pathways and requires GLP-1 receptor, *Mol. Cell. Endocrinol.*, **325**, 26-35.
12. Ding, W. G., and Gromada, J. (1997) Protein kinase A-dependent stimulation of exocytosis in mouse pancreatic beta-cells by glucose-dependent insulinotropic polypeptide, *Diabetes*, **46**, 615-621.
13. Knop, F. K., Visboll, T., and Holst, J. J. (2009) Incretin-based therapy of type 2 diabetes mellitus, *Curr. Protein. Pept. Sci.*, **10**, 46-55.
14. Campbell, J. E., and Drucker, D. J. (2013) Pharmacology, physiology and mechanisms of incretin hormone action, *Cell. Metab.*, **17**, 819-837.
15. Young, A. A., Gedulin, B. R., Bhavsar, S., Bodkin, N., Jodka, C., et al. (1999) Glucose-lowering and insulin-sensitizing actions of exendin-4: studies in obese diabetic (ob/ob, db/db) mice, diabetic fatty Zucker rats, and diabetic rhesus monkeys (*Macaca mulatta*), *Diabetes*, **48**, 1026-1034.
16. Challa, T. D., Beaton, N., Arnold, M., Rudofsky, G., Langhans, W., and Wolfrum, C. (2012) Regulation of adipocyte formation by GLP-1/GLP-1R signaling, *J. Biol. Chem.*, **287**, 6421-6430.
17. Chen, J., Zhao, H., Ma, X., Zhang, Y., Lu, S., et al. (2017) GLP-1/GLP-1R signaling in regulation of adipocyte differentiation and lipogenesis, *Cell. Physiol. Biochem.*, **42**, 1165-1176.
18. Vendrell, J., Bekay, R. E., Peral, B., Garcia-Fuentes, E., Megia, A., et al. (2011) Study of the potential association of adipose tissue GLP-1 receptor with obesity and insulin resistance, *Endocrinology*, **152**, 4072-4079.
19. Zebisch, K., Voight, V., Wabitsch, M., and Brandsch, M. (2012) Protocol for effective differentiation of 3T3-L1 cells to adipocytes, *Anal. Biochem.*, **425**, 8890.
20. Miller, C. N., Yang, J. Y., England, E., Yin, A., Baile, C. A., and Rayalam, S. (2015) Isoproterenol increases uncoupling, glycolysis, and markers of being in mature 3T3-L1 adipocytes, *PLoS One*, **10**, e0138344.
21. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **15**, 680-685.
22. Bao, Y., Jiang, L., Chen, H., Zou, J., Liu, Z., and Shi, Y. (2015) The neuroprotective effect of liraglutide is mediated by glucagon-like peptide 1 receptor-mediated activation of cAMP/PKA/CREB pathway, *Cell. Physiol. Biochem.*, **36**, 2366-2378.
23. Kimura, T., Kaneto, H., Shimoda, M., Hirukawa, H., Okauchi, S., et al. (2015) Protective effects of pioglitazone and/or liraglutide on pancreatic  $\beta$ -cells in db/db mice: comparison of their effects between in an early and advanced stage of diabetes, *Mol. Cell. Endocrinol.*, **400**, 78-89.
24. Que, Q., Guo, X., Zhan, L., Chen, S., Zhang, Z., et al. (2019) The GLP-1 agonist, liraglutide, ameliorates inflammation through the activation of the PKA/CREB pathway in a rat model of knee osteoarthritis, *J. Inflamm. (Lond)*, **16**, 13.
25. Haslam, R. J., Davidson, M. M., and Desjardins, J. V. (1978) Inhibition of adenylate cyclase by adenosine analogues in preparations of broken and intact human platelets. Evidence for the unidirectional control of platelet function by cyclic AMP, *Biochem. J.*, **176**, 83-95.
26. Juan, C., Chang, C., Lai, Y., and Ho, L. (2005) Endothelin-1 induces lipolysis in 3T3-L1 adipocytes, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **288**, E1146-E1152.
27. Li, F., Wang, D., Zhou, Y., Zhou, B., Yang, Y., et al. (2008) Protein kinase A suppresses the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes, *Cell. Res.*, **18**, 311-323.
28. Wang, Q., and Brubaker, P. (2002) Glucagon-like peptide 1 treatment delays the onset of diabetes in 8 week-old db/db mice, *Diabetologia*, **45**, 1263-1273.
29. Willard, F. S., and Sloop, K. W. (2012) Physiology and emerging biochemistry of the glucagon-like peptide-1 receptor, *Exp. Diab. Res.*, **2012**, 470851.
30. Cho, Y. M., Fujita, Y., and Kieffer, T. J. (2014) Glucagon-like peptide-1: glucose homeostasis and beyond, *Annu. Rev. Physiol.*, **76**, 533-536.
31. Nauck, M. A., Vardarli, I., Deacon, C. F., Holst, J. J., and Meier, J. J. (2011) Secretion of glucagon-like peptide 1 (GLP-1) in type 2 diabetes: what is up, what is down? *Diabetologia*, **54**, 10-18.
32. Woerle, H. J., Carneiro, L., Derani, A., Goke, B., and Schirra, J. (2012) The role of endogenous incretin secretion as amplifier of glucose-stimulated insulin secretion in healthy subjects and patients with type 2 diabetes, *Diabetes*, **61**, 2349-2358.
33. Ahren, B. (2013) Incretin dysfunction in type 2 diabetes: clinical impact and future perspectives, *Diabetes. Metab.*, **39**, 195-201.
34. Peters, A. (2010) Incretin-based therapies: review of current clinical trial data, *Am. J. Med.*, **123**, S28-S37.
35. Drucker, D. J., Sherman, S. I., Gorelick, F. S., Bergenstal, R. M., Sherwin, R. S., and Buse, J. B. (2010) Incretin-based therapies for the treatment of type 2 diabetes: evaluation of the risks and benefit, *Diabetes Care*, **33**, 428-433.
36. Lockie, S. H., Heppner, K. M., Chaudhary, N., Chabenne, J. R., Morgan, D. A., et al. (2012) Direct control of brown adipose tissue thermogenesis by central nervous system glucagon-like peptide-1 receptor signaling, *Diabetes*, **61**, 2753-2762.
37. Beiroa, D., Imbernon, M., Gallego, R., Senra, A., Herranz, D., et al. (2014) GLP-1 agonism stimulates brown adipose tissue thermogenesis and browning through hypothalamic AMPK, *Diabetes*, **63**, 3346-3358.
38. Kooijman, S., Wang, Y., Parlevliet, E.T., Boon, M.R., Edelschaap, D., et al. (2015) Central GLP-1 receptor signalling accelerates plasma clearance of triacylglycerol and glucose by activating brown adipose tissue in mice, *Diabetologia*, **58**, 2637-2646.
39. Ejarque, M., Guerrero-Pérez, F., de la Morena, N., Casajoana, A., Virgili, N., et al. (2019) Role of adipose tissue GLP-1R expression in metabolic improvement after bariatric surgery in patients with type 2 diabetes, *Sci. Rep.*, **9**, 6274.
40. Quoyer, J., Longuet, C., Broca, C., Linck, N., Costes, S., et al. (2010) GLP-1 mediates antiapoptotic effect by phosphorylating Bad through a  $\beta$ -arrestin 1-mediated ERK1/2 activation in pancreatic  $\beta$ -cells, *J. Biol. Chem.*, **285**, 1989-2002.
41. Li, Y., Tweedie, D., Mattson, M. P., Holloway, H. W., and Greig, N. H. (2010) Enhancing the GLP-1 receptor signaling pathway leads to proliferation and neuroprotection in human neuroblastoma cells, *J. Neurochem.*, **113**, 1621-1631.
42. Shiraishi, D., Fujiwara, Y., Komohara, Y., Mizuta, H., and Takeya, M. (2012) Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) induces M2 polarization of human macrophages via STAT3 activation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **425**, 304-308.
43. Lee, Y. S., Park, M. S., Choung, J. S., Kim, S. S., et al. (2012) Glucagon-like peptide-1 inhibits adipose tissue macrophage infiltration and inflammation in an obese mouse model of diabetes, *Diabetologia*, **55**, 2456-2468.
44. Gao, H., Wang, X., Zhang, Z., Yang, Y., Yang, J., et al. (2007) GLP-1 amplifies insulin signaling by up-regulation of IRbeta, IRS-1 and Glut4 in 3T3-L1 adipocytes, *Endocrine*, **32**, 90-95.
45. Hai, T., and Curran, T. (1991) Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 3720-3724.

**DIRECT ACTION OF GLUCAGON-LIKE PEPTIDE TYPE 1  
SYNTHETIC ANALOGUE LIRAGLUTIDE REALIZES  
THROUGH ADENYLATE-CYCLASE-DEPENDENT  
ENHANCING OF INSULIN SENSITIVITY\***

**E. D. Mamontova<sup>1,2,3</sup>, S. S. Michurina<sup>1,2</sup>, I. S. Stafeev<sup>2\*\*</sup>, E. L. Sorkina<sup>3</sup>, I. A. Sklyanik<sup>3</sup>,  
E. O. Koksharova<sup>3</sup>, M. Y. Menshikov<sup>2</sup>, M. V. Shestakova<sup>3</sup>, and Ye. V. Parfyonova<sup>2,4</sup>**

<sup>1</sup> Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia

<sup>2</sup> Institute of Experimental Cardiology, National Medical Research Centre for Cardiology,  
121552 Moscow, Russia; E-mail: yuristafeev@gmail.com

<sup>3</sup> Diabetes Institute, Endocrinology Research Centre, 117036 Moscow, Russia

<sup>4</sup> Faculty of Basic Medicine, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia

Incretin hormones analogues, including glucagon-like peptide type 1 (GLP-1), have complex glucose-lowering, anorexigenic and cardioprotective action. Mechanisms of GLP-1 and its analogues action are well known for pancreatic  $\beta$ -cells, hepatocytes and other tissues. Nevertheless, effects of GLP-1 and its analogues during local action in adipose tissue remain unclear. In the present work we have performed the evaluation of GLP-1 synthetic analogue liraglutide on adipogenesis and insulin sensitivity of 3T3-L1 adipocytes. Methods: In our work we have performed white and beige adipogenic differentiations during 10 days with or without 100 nM of liraglutide. Differentiation results were estimated by phase contrast microscopy and optical density of OilRedO extract. Then activation and expression of kinases Erk and JNK were evaluated in dependent of incubation time with liraglutide by Western blotting. For further understanding of liraglutide action mature adipocytes treated by adenylate cyclase inhibitor SQ22536. Hereinafter we have estimated insulin sensitivity of mature adipocytes by Western blotting and insulin-dependent glucose uptake. Results: During our work we have shown the absence of any significant influences of liraglutide on beige adipogenic differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. It's worth noting that in white adipocytes liraglutide statistically significant increases UCP-1 expression. The investigation of pro-mitogenic kinase Erk and pro-inflammatory kinase JNK activities during liraglutide action has shown stimulation of Erk activation with absence of any effects on JNK activation. Simultaneous treatment of cells by liraglutide and adenylate cyclase inhibitor SQ22536 has caused suppression of Erk expression and activation of JNK expression which testify about adenylate cyclase participation in pro-mitogenic and anti-inflammatory liraglutide actions. Liraglutide stimulates expression of insulin receptor substrate IRS-1 and Akt kinase and also enhances glucose uptake by adipocytes and GLUT4 expression. All these effects were resolved under SQ22536 treatment. Conclusions: In present work it has shown enhancing of insulin sensitivity of mature adipocytes by GLP-1 synthetic analogue liraglutide which was mediated by adenylate cyclase. Liraglutide have not shown any significant action on beige adipogenesis, but have enhanced UCP-1 expression in white adipocytes. Obtained results testify about positive insulin-sensitizing direct effect of liraglutide on mature adipocytes.

*Keywords:* insulin resistance, adipocyte, GLP-1, incretins