

УДК 577.352.4

## ХИМИЧЕСКИЙ ШАПЕРОН РВА ОСЛАБЛЯЕТ ЭПР-СТРЕСС И АКТИВИРУЕТ ЭКСПРЕССИЮ SOCS3, РЕГУЛЯТОРА ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛОВ ЛЕПТИНА

© 2021 Б. Баба<sup>1</sup>, М. Чальшкан<sup>2</sup>, Г. Бёюк<sup>3</sup>, А. Хаджишевски<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Medical Biochemistry, Faculty of Medicine, Yüksek İhtisas University, 06520 Ankara, Turkey

<sup>2</sup> Department of Genetic, Gaziosmanpaşa Hospital, Yeni Yüzyıl University, 34245 Istanbul, Turkey

<sup>3</sup> Department of Physiology, Faculty of Medicine, Ankara Medipol University, 06050 Ankara, Turkey

<sup>4</sup> Department of Biochemistry, Faculty of Pharmacy, Gazi University, 06100 Ankara, Turkey; E-mail: abozkir@gazi.edu.tr

Поступила в редакцию 08.09.2020

После доработки 22.12.2020

Принята к публикации 22.12.2020

Эндоплазматический ретикулум (ЭПР) очень чувствителен к питательному и энергетическому состоянию клеток. Нарушение гомеостаза ЭПР приводит к накоплению развернутых/неправильно свернутых белков в просвете ЭПР, что определяется как ЭПР-стресс. ЭПР-стресс запускает процесс отклика на неструктурированные белки (UPR). Предполагается, что хронический стресс ЭПР связан с ожирением и резистентностью к лептину. Мы стремились изучить роль ЭПР-стресса и эффект воздействия фенолмасляной кислоты (РВА), ингибитора ЭПР-стресса, на ожирение, а также их влияние на передачу сигналов лептина. В этом исследовании участвовали двадцать четыре худых и двадцать четыре лептин-дефицитных (ob/ob) мышей. В соответствии с введением РВА эти мыши были разделены на две группы. Островки поджелудочной железы выделяли, затем инкубировали с лептином в течение 48 часов. С помощью ПЦР в реальном времени в островках измеряли экспрессию С/ЕВР гомологичного белка (СНОР) и X-бок связывающего белка (ХВР1) в качестве сигнальных индикаторов UPR, а также экспрессию супрессора цитокиновой передачи сигнала 3 (SOCS3) в качестве регулятора передачи сигналов лептина. Уровни экспрессии ХВР1 и СНОР были заметно увеличены в ob/ob-контроле по сравнению с другими группами с обработкой лептином и без него. Соответственно, не было значительных различий в уровне экспрессии ХВР1 и СНОР для ob/ob мышей, получивших РВА, и худых мышей. После обработки лептином уровень экспрессии SOCS3 был значительно повышен у ob/ob мышей, получивших РВА, по сравнению с контрольными ob/ob. Не было существенной разницы между ob/ob мышью, получившими РВА, и худыми мышью в отношении уровней SOCS3 с обработкой лептином и без него. Наши результаты показали, что ЭПР-стресс играет важную роль в патологии ожирения, а также, что РВА снижает ЭПР-стресс и может потенциально улучшить передачу сигналов лептина.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** химический шаперон, стресс эндоплазматического ретикулума, передача сигнала лептина, ожирение, фенолмасляная кислота, отклик на неструктурированные белки.

DOI: 10.31857/S0320972521040084

### ВВЕДЕНИЕ

Ожирение – глобальная проблема здравоохранения с высокими показателями заболеваемости и смертности в развитых и развивающихся странах [1, 2]. Обычно это связано с системным и местным воспалением, а также с повы-

шенной выработкой лептина [3, 4]. Лептин обладает действием против ожирения, однако большинство пациентов с ожирением неадекватно реагируют на повышение уровня лептина [1, 5]. Следовательно, устойчивость к лептину в основном используется для описания состояний ожирения, при которых наблюдается гиперлептинемия и/или снижение чувствительности к лечению лептином [4]. Связывание лептина с его рецептором приводит к активации белков JAK, которые фосфорилируют несколько остатков тирозина на рецепторе лептина, обеспечивая рекрутирование и фосфорилирование STAT. Резистентность к лептину связывают со снижением лептин-опосредованной JAK-STAT передачей сигнала [6]. Возможно, SOCS3 или протеин-тирозинфосфатаза 1В (PTP1B)

Принятые сокращения: ЭПР – эндоплазматический ретикулум; СНОР – С/ЕВР гомологичный белок; eIF2a – фактор инициации эукариот 2a; ob/ob – мыши с дефицитом лептина; РВА – фенолмасляная кислота (phenylbutyric acid); SOCS3 – супрессор цитокиновой передачи сигнала; Stat3 – преобразователь сигнала и активатор транскрипции 3; UPR – отклик на неструктурированные белки (unfolded protein response); ХВР1 – X-бок-связывающий белок.

\* Адресат для корреспонденции.

участвуют в возникновении устойчивости к лептину. Однако подробный механизм устойчивости к лептину плохо изучен [5]. Недавно было высказано предположение, что стресс эндоплазматического ретикулума участвует в патогенезе резистентности к лептину [7, 8].

Дисбаланс между действительной нагрузкой на ЭПР по фолдингу белка и способности ЭПР делать это без ошибок приводит к накоплению развернутых или неправильно свернутых белков в просвете ЭПР, что называется ЭПР-стрессом [9]. Чтобы уменьшить ЭПР-стресс и обеспечить правильное сворачивание белка, ЭПР активирует адаптивный ответ, инициируя некоторые каскады передачи сигналов, называемые откликом на неструктурированные белки (UPR) [10]. В физиологических условиях UPR служит программой выживания клеток, защищающей от повреждений, вызванных ЭПР-стрессом, или повышенными рабочими нагрузками [11]. Однако при тяжелом или хроническом стрессе UPR может стимулировать гибель клеток посредством апоптоза [12].

Отклик на неструктурированные белки инициируется активацией трех основных трансдукторов: (протеинкиназа R)-подобной киназы эндоплазматического ретикулума (PERK), активирующего фактора транскрипции 6 (ATF6) и инозитол-требующего фермента 1 (IRE1) [11, 12–15]. Активация PERK приводит к фосфорилированию фактора инициации эукариот 2 $\alpha$  (eIf2 $\alpha$ ), который ослабляет общий синтез белка и рабочую нагрузку на ЭПР [12, 13, 16].

Апоптоз, вызванный стрессом ЭПР, в основном опосредуется С/ЕВР гомологичным белком, СНОР, который является фактором транскрипции, индуцирующим экспрессию множества проапоптотических факторов, и расположен ниже PERK–eIf2 $\alpha$ –ATF4- и ATF6-путей в UPR [9]. ATF6 регулирует экспрессию генов шаперонов ЭПР и ЭПР-ассоциированных генов деградации для улучшения производительности работы шаперонов, деградации развернутых белков и предотвращения протеотоксичности ЭПР [14]. Активированный IRE1 обладает эндонуклеазной активностью и сплайсирует мРНК фактора транскрипции XBP1. X-box-связывающий белок, XBP1, стимулирует транскрипцию генов, участвующих в сворачивании белков, созревании и деградации неправильно свернутых белков. Кроме того, IRE1 также активирует фактор 2, связанный с рецептором фактора некроза опухоли (TRAF2), способствуя активации N-терминальной киназы c-Jun (JNK) и ядерного фактора-кВ (NF-кВ) [17]. Повышенные уровни JNK и NF-кВ способствуют выработке провоспалительных цитокинов, что приводит к

дальнейшему воспалению и ЭПР-стрессу [16]. Недавние исследования предоставляют убедительные доказательства того, что гомеостаз ЭПР активно участвует в основных механизмах, связывающих ожирение и диабет [10, 11].

$\beta$ -Клетки являются клетками секреции, они имеют высокоразвитый ЭПР и, следовательно, более чувствительны к развитию ЭПР-стресса [18]. Химические шапероны – это небольшие молекулы, которые увеличивают работоспособность ЭПР и улучшают способность ЭПР к фолдингу белков [8, 19]. На сегодняшний день два химических шаперона, фенилмасляная кислота (РВА) и тауроурсодезоксихолевая кислота (TUDCA), были одобрены Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов [8, 15]. РВА представляет собой низкомолекулярную жирную кислоту с шапероноподобной активностью, которая может стабилизировать конформацию белка, улучшать способность ЭПР к фолдингу белков и облегчать транспортировку мутантных белков [15, 19]. В нашем исследовании мы стремились изучить роль стресса ЭПР и влияние фенилмасляной кислоты на ожирение, а также их воздействие на передачу сигналов лептина в островках поджелудочной железы. Поэтому мы решили оценить сигнальные маркеры UPR и лептина на моделях мышей с ожирением.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Животные и экспериментальный план.** Это исследование включало контрольную группу из двадцати четырех худых мышей дикого типа и двадцати четырех мышей C57BL/6 с дефицитом лептина (ob/ob). Самцы мышей, мыши ob/ob в возрасте 12–16 недель и их контрольная группа худых мышей были предоставлены больницей. Мышей содержали в комнате при световом режиме 12/12, стандартный гранулированный корм и вода были предоставлены в свободном доступе. В течение первых трех дней 100 мкл PBS (фосфатно-буферный раствор) вводили худым мышам и мышам ob/ob через желудочный зонд 2 раза в день (утром, в 9 ч и вечером, в 17 ч). Через 3 дня были взяты образцы крови из хвостовой вены для измерения уровней циркулирующего инсулина после 6-часового голодания. Затем были начаты введения PBS и РВА (нулевой день). Мышам ob/ob, а также худым мышам того же возраста и пола (12 мышей в каждой группе) через оральный желудочный зонд вводили 500 мг/кг РВА («Sigma», Германия) 2 раза в день (всего 1 г/кг/день) или PBS (плацебо) в течение 30 дней [8, 19]. Во всех группах периоди-

чески проверяли концентрацию глюкозы в крови в сытом состоянии и массу тела. Для оценки чувствительности к инсулину на 15-й день выполняли тест на толерантность к инсулину (ИТТ) и тест на толерантность к глюкозе (ГТТ) – на 16-й день. Для оценки уровня инсулина у мышей были взяты дополнительные образцы крови. Животных умерщвляли с помощью ксилазина/кетамина после 6-часового голодания на 30-й день и выделяли островки поджелудочной железы.

#### **Тесты на толерантность к инсулину и глюкозе.**

Были выполнены тест на толерантность к инсулину – на 15-й день и тест на толерантность к глюкозе – на 16-й день. Утром после введения РВА или PBS мыши голодали в течение 6 ч. Затем подкожно вводили 2 МЕ/кг инсулина и измеряли концентрацию глюкозы в крови в течение 2 ч (0, 30, 60, 90 и 120 мин). Для ГТТ всем мышам вводили РВА или PBS вечером и не кормили в течение ночи (~12 ч). После этого периода РВА или PBS не вводили утром, а вводили низкую дозу глюкозы (0,5 г/кг) внутривенно. Затем в течение 2 ч (0, 30, 60, 90 и 120 мин) измеряли концентрацию глюкозы в крови [19].

#### **Выделение островков и клеточная культура.**

Выделение островков проводили после окончания всех введений. Островки поджелудочной железы мышей выделяли в соответствии с ранее опубликованным методом Carter et al. [20] с модификациями. После умерщвления мышей островки выделяли путем расщепления коллагеназой. Раствор коллагеназы типа V («Sigma») в сбалансированном солевом растворе Хэнкса (HBSS) вводили в проток поджелудочной железы, и надували поджелудочную железу перед ее удалением. Удаленную поджелудочную железу выдерживали при 37 °С в течение 18 мин для процесса ферментативного переваривания. После инкубации в каждую пробирку добавляли 25 мл холодного HBSS (10% FBS, 1% L-глутамин, 1%-ная смесь антибиотиков (пенициллин/стрептомицин) «Sigma»), а затем центрифугировали при 1300 об./мин, 3 мин при 4 °С. Этот шаг повторяли трижды. Островковые клетки очищали с использованием Biscoll 1100 и Biscoll 1077 («Biochrom», Великобритания) и RPMI-1640 (10% FBS, 1% L-глутамин, 1%-ная смесь антибиотиков (пенициллин/стрептомицин), 25 мМ HEPES) («Sigma»), а затем подсчитывали. Островки от двух мышей объединяли в один образец, чтобы получить достаточное и относительно одинаковое количество островков для каждой группы. Всего было получено шесть образцов от двенадцати мышей на группу в соответствии с введением РВА. Все образцы были разделены на равные партии для дальнейшего

изучения влияния обработки лептином. Одну из партий инкубировали с 13,5 нмоль/мл лептина в течение 48 ч при 37 °С в инкубаторе в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>, а другую – инкубировали без лептина [21]. В конечном итоге для каждой группы было получено по шесть образцов обработанных и не обработанных лептином. Затем островки из всех образцов были разделены для определения жизнеспособности клеток, проведения ПЦР-РВ и вестерн-блоттинга. Визуализацию островков с помощью инвертированного микроскопа выполняли путем окрашивания клеток дитизоном (использовали раствор 10 мг/мл в ДМСО) (рис. S1–S4 в Приложении).

**Анализ жизнеспособности клеток.** Жизнеспособность островков во всех группах с обработкой лептином и без нее определяли с помощью флуоресцентного микроскопа с использованием двойной окраски (флуоресцеин диацетат/пропидий йодид). Сначала 910 мкл DPBS (фосфатно-солевой буфер по Дульбекко (рН 7,4)) («Biowest», Франция) помещали в чашку Петри диаметром 35 мм, а затем в чашку добавляли 90 мкл образца островков. После этого добавляли 20 мкл стокового раствора флуоресцеин диацетата («Sigma»), (24 мкМ; 1 мг флуоресцеин диацетата растворяли в 100 мл ацетона) и 20 мкл стокового раствора пропидий йодида («Sigma»), (750 мкМ; 5 мг пропидий йодида растворяли в 10 мл PBS (рН 7,4)). Затем чашки Петри помещали в темное место на 5 мин. Жизнеспособность исследовали при 40× увеличении на флуоресцентном микроскопе («Leica», Германия). С помощью программы MAT-LAB были сделаны фотографии островков, и был определен процент жизнеспособности островков (рис. S1–S6 в Приложении).

**ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ).** Всю РНК извлекали из островков с помощью набора «Total RNA isolation kit» («5 Prime», США) в соответствии с инструкциями производителя и количественно определяли с помощью «NanoDrop» («Thermo Fisher», США). Равные количества РНК во всех группах с обработкой лептином и без нее подвергали обратной транскрипции с использованием набора «cDNA synthesis kit» («Qiagen», США). Для ПЦР-РВ использовали набор «RT-PCR kit» («Qiagen»). К образцам кДНК добавляли смесь ПЦР-РВ. Последовательности праймеров, использованных в работе представлены в таблице.

Пробирки для ПЦР помещали в прибор Rotor-Gene Q («Qiagen») и проводили ПЦР-РВ в течение 40 циклов в следующих условиях: 94 °С – 15 с; 61 °С – 30 с; 72 °С – 30 с. Данные из объединенных пяти отдельных образцов в каждой группе с обработкой лептином и без него

Последовательности праймеров, использованных в работе

Название праймера	5'–3' последовательность праймеров
СНОР (FW)	5'-AACAGAGGTCACACGCACAT-3'
СНОР (RV)	5'-ACTTTCCGCTCGTTCTCCTG-3'
XBP1s (FW)	5'-GGTCTGCTGAGTCCGCAGCAGG-3'
XBP1s (RV)	5'-AGGCTTGGTGTATACATGG-3'
SOCS3 (FW)	5'-CTTTTCTTTGCCACCCACGG-3'
SOCS3 (RV)	5'-CCGTTGACAGTCTTCCGACA-3'
GAPDH (FW)	5'-AGGTCGGTGTGAACGGATTTG-3'
GAPDH (RV)	5'-TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA-3'

анализировали с использованием метода  $2^{-\Delta\Delta CT}$  [22].

**Вестерн-блоттинг.** Выделение белков проводили по методике производителя с использованием набора «Protein isolation kit» («Millipore», Германия). Из каждой группы, с обработкой лептином и без нее, были объединены образцы для измерения концентрации белка методом Брэдфорда [23]. Белки (25 мкг) загружали в гель «Mini-Protean TGX Stain Free Gels» («Biorad», США), и разделение проходило при 150 В в течение 1 ч. Перенос на мембрану PVDF (поливинилиденфторид, «Biorad») осуществляли при 25 В и 2,5 А за 8 мин. После переноса мембраны блокировали в блокирующем буфере (TBST в присутствии 5% BSA (w/v)) в течение 1 ч при комнатной температуре на шейкере. Блокирующий буфер откачивали, и мембрану промывали 3 раза TBST в течение 10 мин. Белок-специфичные первичные антитела, работающие в блокирующем буфере, разбавляли соответствующим образом и встряхивали при 4 °С на шейкере в течение 12–16 ч [elf2 $\alpha$ , p-elf2 $\alpha$ , Stat3, антитела к  $\beta$ -актину (1/1000) и p-Stat3-антитела (1/750); («Cell signaling», США)]. После этого мембрану промывали TBST (4 раза по 5 мин), далее мембрану обрабатывали вторичными антителами при комнатной температуре в течение 1 ч на шейкере («Anti-rabbit» и «Anti-mouse» (1/2000); («Cell signaling»)). Затем мембрану снова промывали TBST (4 раза по 5 мин). Полосы белка выявляли с использованием растворов люминола («Santa-Cruz», США), а изображения получали с помощью устройства визуализации «Molecular Imager ChemiDoc XRS +» («Biorad»). Каждую полосу анализировали программой «Image Lab» (версия программного обеспечения 5.2.1.). Данные, полученные на основе площади полос и их интенсивности, нормализовали в сравнении с бета-актином. Использовались нормализованные данные для всех групповых

сравнений. Однако из-за небольшого количества островков и, следовательно, небольшого количества белка, доступного для анализа, исследование включало один эксперимент, и поэтому статистический анализ не мог быть выполнен (рис. S7 и S8 в Приложении).

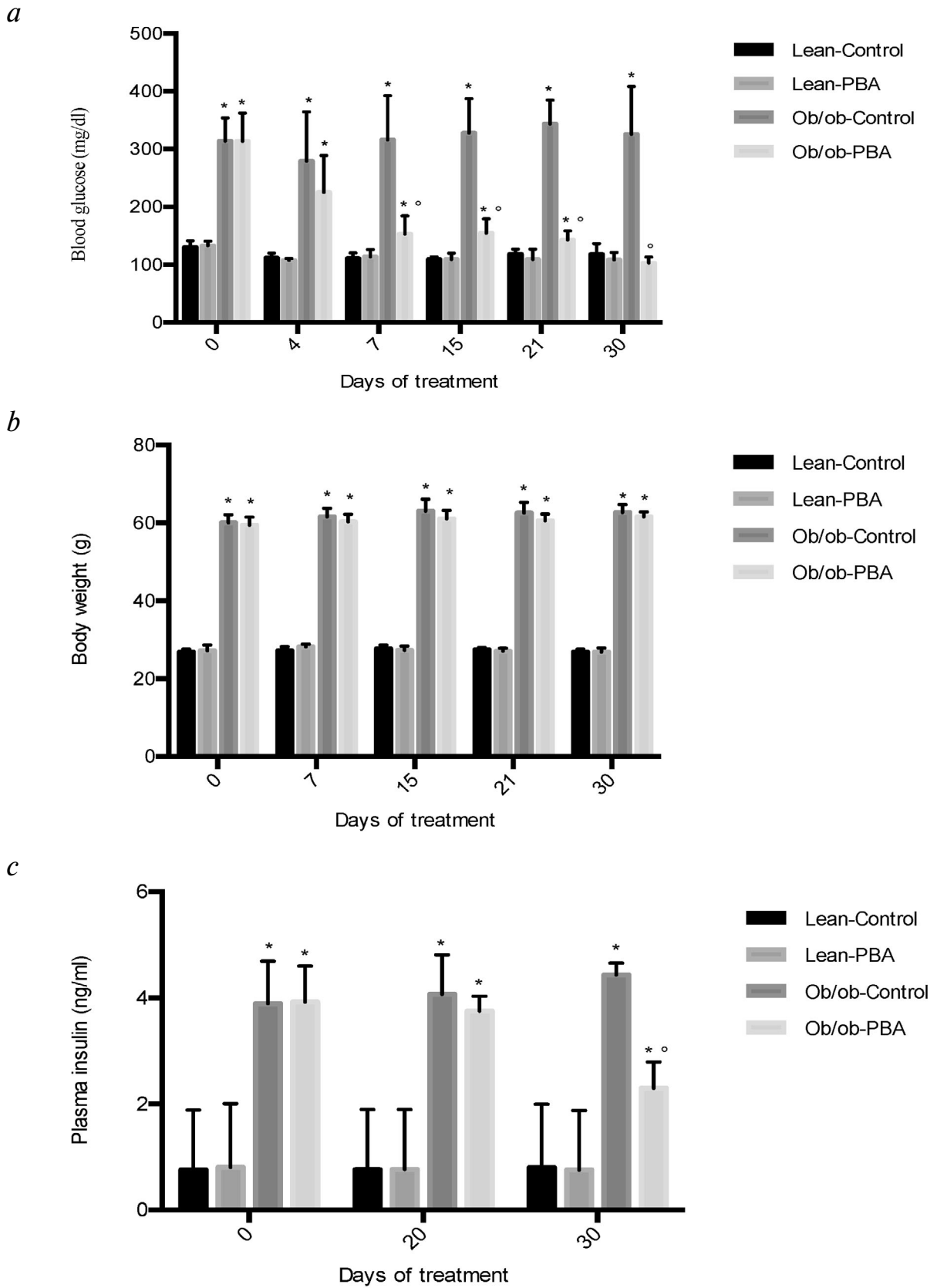
**Измерение уровня инсулина.** Уровни инсулина в плазме определяли с помощью набора «Elisa kit» («Millipore») в соответствии с инструкциями производителя.

**Статистический анализ.** Для статистического анализа использовалась компьютерная программа SPSS (версия 16.00). Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка (SE). U-критерий Манна–Уитни использовали для определения значимости различий между группами, критерий знаковых рангов Вилкоксона использовали для внутригруппового сравнения, а дисперсионный анализ Краскела–Уоллиса использовали для проверки различий между более чем двумя независимыми группами. Связь между переменными анализировали с помощью коэффициента Спирмена. Статистически значимыми считались результаты при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

**Эффект от введения РВА *in vivo*.** Уровни глюкозы в крови в состоянии сытости и масса тела всех мышей отслеживали через определенные интервалы. Как и ожидалось, у контрольных животных ob/ob, получавших плацебо, уровень глюкозы в крови был значительно выше и сильнее отличался от уровня глюкозы худых мышей в дни исследования. У мышей ob/ob, получавших РВА, уровень глюкозы в крови был значительно ниже, чем у контрольной группы ob/ob с 7-го по 30-й дни. У мышей ob/ob, получавших РВА, на 30-й день уровень глюкозы в крови стал нормогликемическим, такой же как у худых мышей. Не было существенной разницы между ob/ob мышцами, получавшими РВА, и их контрольной группой по массе тела (рис. 1, а и б). При сравнении уровня инсулина в плазме всех экспериментальных групп было обнаружено, что уровень инсулина у мышей ob/ob, получавших РВА и плацебо, был значительно выше, чем у худых мышей, получавших РВА и плацебо. Не было статистически значимой разницы в уровне инсулина в 0 и 20 дней между мышцами ob/ob, получавшими РВА и плацебо, однако введение РВА привело к значительному снижению уровня инсулина на 30-й день (рис. 1, с).

Чтобы оценить чувствительность к инсулину, был проведен тест на толерантность к инсулину (ИТТ). Было определено, что чувствительность к



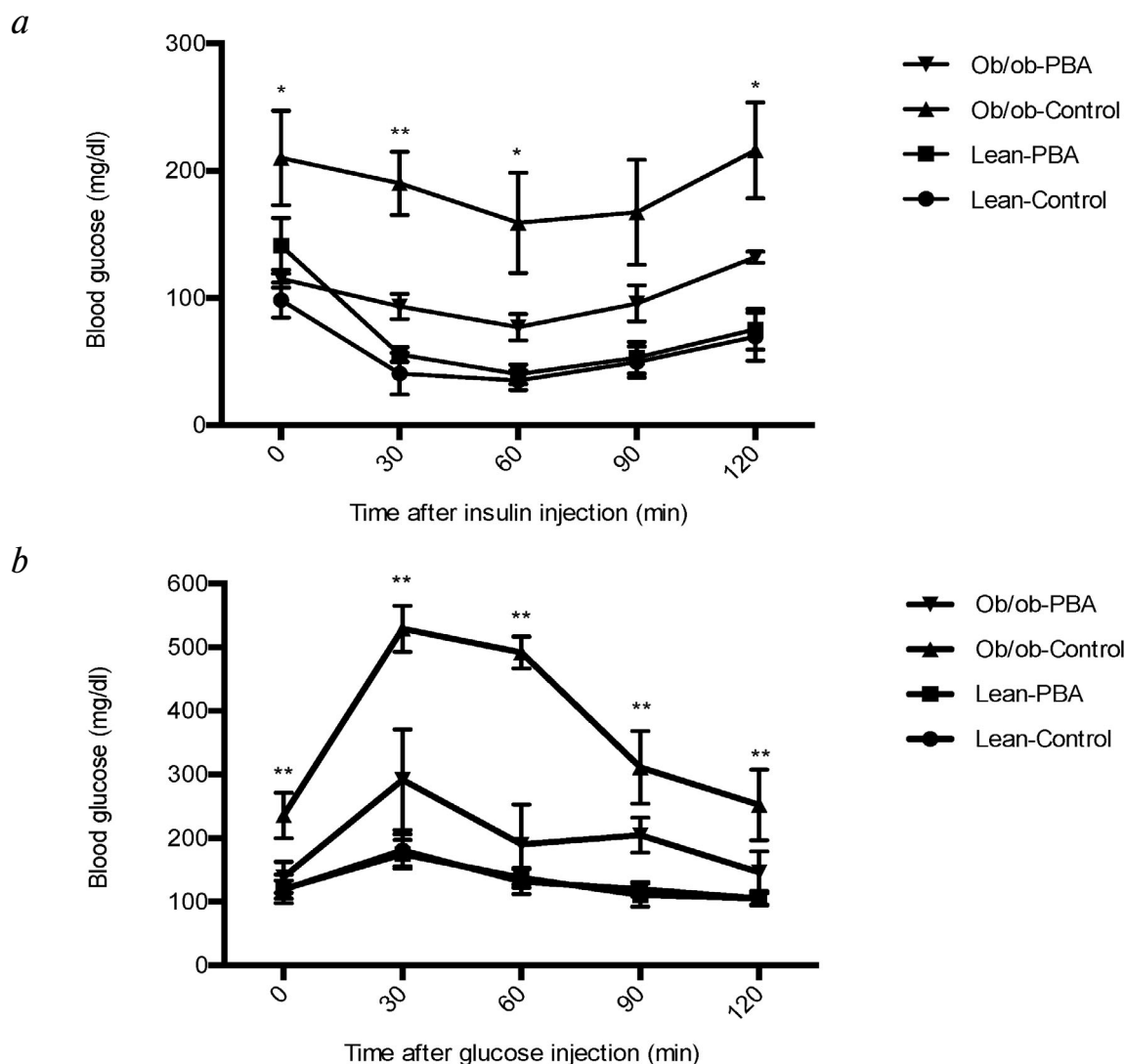
**Рис. 1.** Влияние введения PBA на уровень глюкозы в крови (*a*), массу тела (*b*) и концентрацию инсулина (*c*) (по сравнению с группами худых мышей (\* $p < 0,01$ ); по сравнению с контрольными группами *ob/ob* (\* $p < 0,01$ ,  $n = 7$ ))

инсулину у мышей ob/ob, получавших РВА, была выше, чем у мышей ob/ob, получавших плацебо, относительно индуцированной инсулином кривой глюкозы в крови (рис. 2, a). GTT проводился для оценки толерантности к глюкозе. После введения глюкозы у мышей ob/ob, получавших плацебо, определяли тяжелую гипергликемию и ухудшение толерантности к глюкозе. У мышей ob/ob, получавших РВА, толерантность к глюкозе была лучше по сравнению с мышами ob/ob, получавшими плацебо (рис. 2, b).

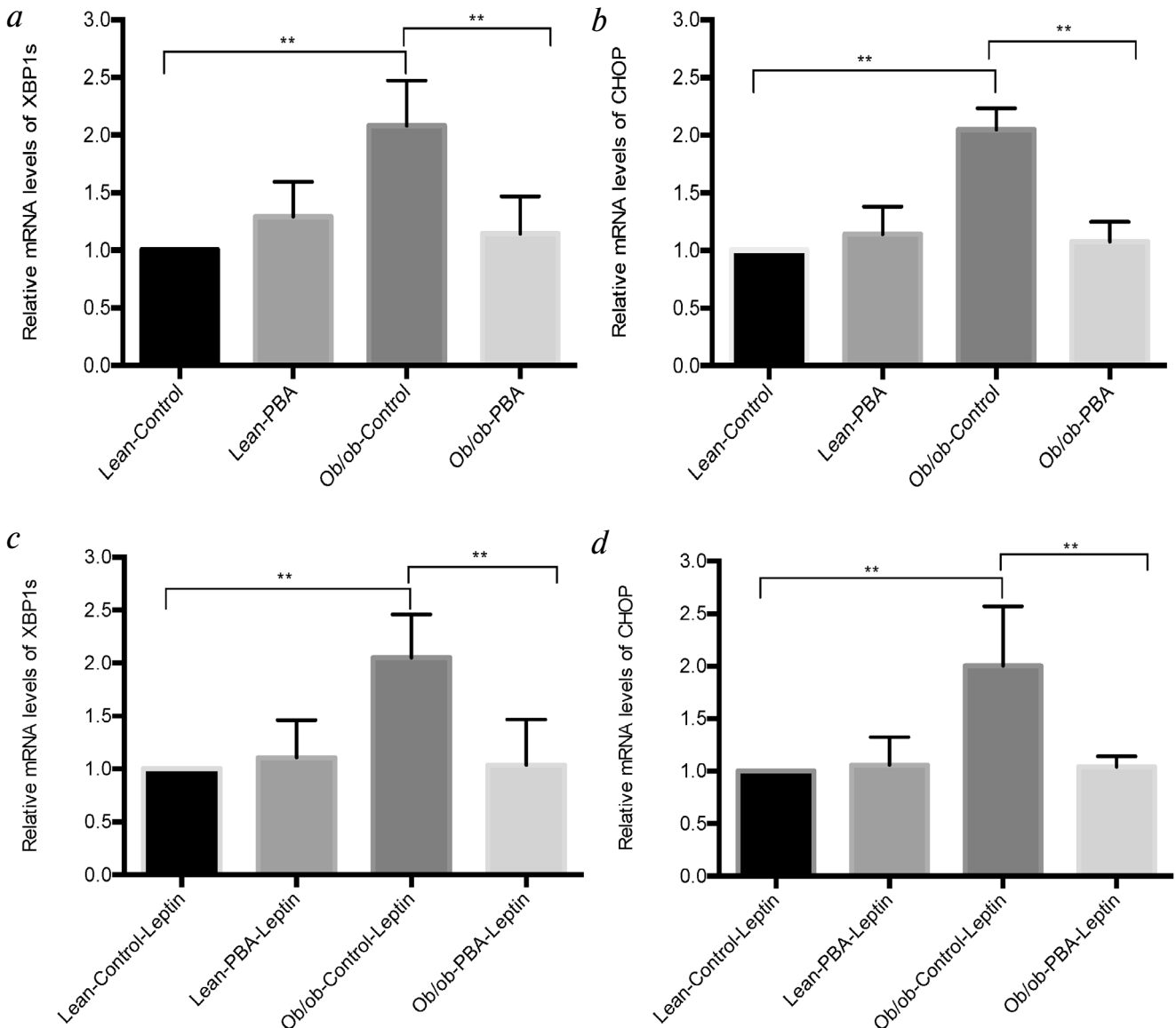
**Введение РВА снижает экспрессию маркеров UPR.** В островках экспрессия белков маркеров сигнальных путей UPR, XBP1 и CHOP определялась во всех группах с обработкой лептином и без него. Уровни мРНК XBP1 и CHOP были заметно увеличены в островках мышей ob/ob, по-

лучавших плацебо, по сравнению с другими группами с обработкой лептином и без него ( $p < 0,01$ ). Не было значительных различий в уровне экспрессии XBP1s и CHOP между островками ob/ob и худых мышей, получавших РВА (рис. 3).

**Введение РВА приводит к усилению передачи сигналов лептина.** Чтобы выяснить, приводит ли введение РВА к изменению уровня SOCS3, мы оценили уровни экспрессии этого маркера в островках. Была проанализирована экспрессия SOCS3 в островках всех групп, обработанных лептином. Был снижен уровень экспрессии SOCS3 в островках мышей ob/ob, получавших плацебо, по сравнению контрольной группой худых мышей с обработкой лептином и без него ( $p < 0,05$ ). Уровень экспрессии SOCS3 был



**Рис. 2.** a – Тест на толерантность к инсулину (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , ob/ob-контроль по сравнению с ob/ob-PBA,  $n = 3-6$ ). b – Тест на толерантность к глюкозе (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , ob/ob-контроль по сравнению с ob/ob-PBA,  $n = 2$ )



**Рис. 3.** Относительная экспрессия XBP1 (*a* и *c*) и CHOP (*b* и *d*) в группах с обработкой лептином (*c* и *d*) и без него (*a* и *b*) (\*\*  $p < 0,01$ ). Были проанализированы данные из пяти объединенных образцов в каждой группе с обработкой лептином и без него

значительно повышен в островках мышей *ob/ob*, получавших PBA, по сравнению с контрольной группой *ob/ob* после обработки лептином ( $p < 0,05$ ). Было отмечено, что нет значительных различий между *ob/ob* мышами, которым вводили PBA, и худыми мышами, при сравнении относительных уровней мРНК SOCS3 у мышей с обработкой лептином и без него (рис. 4).

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящем исследовании мы оценили роль ЭПР-стресса и эффект воздействия хими-

ческого шаперона PBA на ожирение, а также влияние ЭПР-стресса и PBA на передачу сигналов лептина в островках. Это первое исследование, в котором оценивается влияние PBA на передачу сигналов лептина в островках мышей *ob/ob*. Во-первых, в нашем исследовании мы наблюдали воздействие PBA на мышей *ob/ob in vivo*. Было обнаружено, что, хотя контрольные группы *ob/ob* демонстрировали тяжелую гипергликемию, введение PBA мышам *ob/ob* снижало высокий уровень глюкозы в крови до нормогликемического уровня, такого как у худых мышей. В соответствии с существующими данными об уровнях глюкозы в крови, мы обнаружили, что высокие концентрации инсулина у мышей

ob/ob снижались при введении РВА. Однако РВА не влияет на массу тела. Наши результаты показали, что толерантность к глюкозе улучшилась, а чувствительность к инсулину увеличилась при введении РВА мышам ob/ob. Наши данные согласуются с предыдущими исследованиями, которые проводились на моделях мышей с ожирением [8, 19].

ЭПР-стресс стал критическим медиатором в патогенезе ожирения [24]. Недавние исследования показали, что существует связь между ожирением и ЭПР-стрессом. Во многих исследованиях жировой ткани, печени и гипоталамуса мышей с ожирением сообщалось о повышении регуляции маркеров ЭПР-стресса [8, 19, 25–27]. Согласно данным предыдущих исследований, введение РВА и TUDCA снижало ЭПР-стресс в печени, жировой ткани и гипоталамусе [8, 19, 26]. Все больше данных свидетельствует о том, что ЭПР-стресс важен для гомеостаза поджелудочной железы [14]. В физиологических условиях активация передачи сигналов UPR может быть полезной для функции бета-клеток. Однако при патологических условиях длительная передача сигналов UPR может оказывать пагубное влияние на функцию и выживаемость бета-клеток [15, 28]. В случае резистентности к инсулину и ожирения поддержание секреторной функции бета-клеток является большой нагрузкой на ЭПР бета-клеток [29]. Появляется все больше доказательств наличия ЭПР-стресса при диабете [30–32]. В поджелудочной железе пациентов с диабетом 1-го типа была повышена экспрессия островкового ATF3 [33] и CHOP, но XBP1 был сопоставим с контролем [34]. В предыдущих ис-

следованиях островков и/или поджелудочной железы экспрессия генов, связанных со ЭПР-стрессом, была увеличена в экспериментальных моделях [35, 36] и у людей с диабетом 2-го типа [35]. Было высказано предположение, что изменения в экспрессии медиаторов UPR могут вносить вклад в снижение функции островков у мышей и людей с диабетом 2-го типа [29]. Тапсигаргин, который, как известно, индуцирует ЭПР-стресс, увеличивал активацию мРНК XBP1 островков крыс линии Wistar [37] и увеличивал активацию каспазы-3 в INS-клетках, а РВА значительно снижал индуцированную глюкозой экспрессию CHOP и активацию каспазы-3 [38]. Более того, Malo et al. [39] обнаружили, что РВА ингибирует ЭПР-стресс в ацинарных клетках поджелудочной железы крыс. В нашем исследовании мы изучали экспрессию маркеров UPR, включая CHOP и XBP1, и влияние РВА на эти маркеры в островках мышей ob/ob. Наши результаты показали, что зависимые от ЭПР-стресса пути активировались при ожирении, а обработка РВА предотвращала активацию этих компонентов UPR. Наши результаты согласуются с предыдущими исследованиями.

Ожирение связано с развитием ЭПР-стресса и активацией UPR в метаболически активных тканях, что может вызывать нарушение передачи сигналов лептина, способствуя развитию связанной с ожирением резистентности к лептину [2, 40]. В предыдущем исследовании сообщалось, что ЭПР-стресс вызывает нарушение индуцированного лептином фосфорилирования преобразователя сигнала и активатора транскрипции 3 (Stat3) в клетках нейробластомы че-

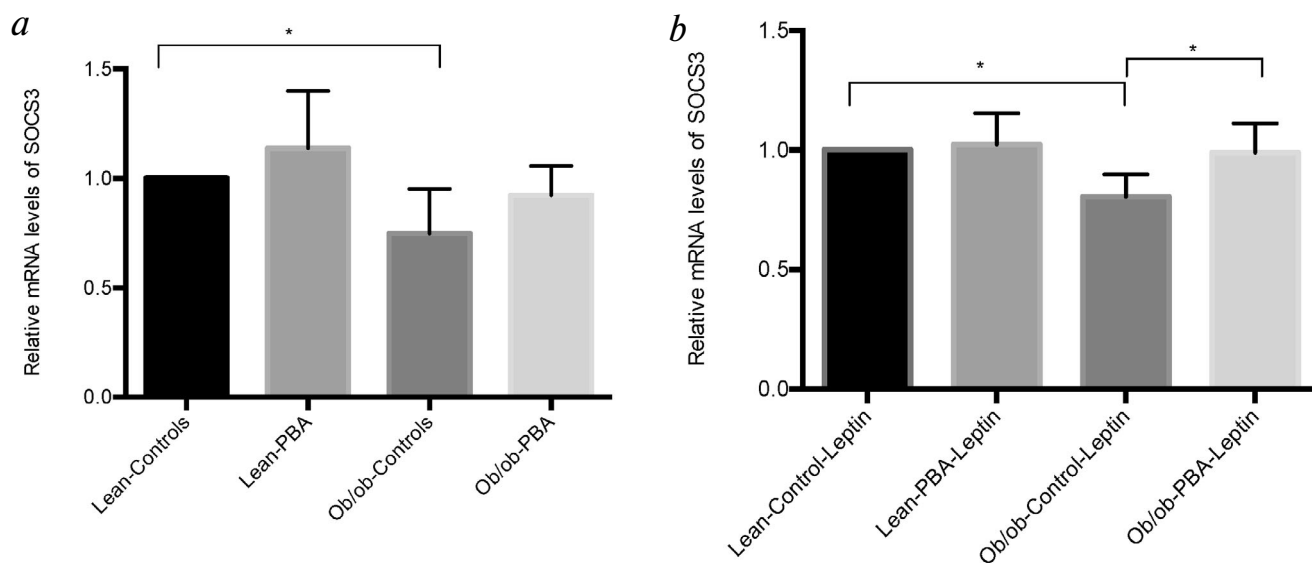


Рис. 4. Относительная экспрессия SOCS3 во всех группах с лечением лептином (a) и без него (b) (\*  $p < 0,05$ ). Были проанализированы данные из пяти объединенных образцов в каждой группе с лечением лептином и без него



ловека [41]. Последние данные свидетельствуют о том, что ЭПР-стресс участвует в резистентности к лептину [41], а химические шапероны, которые снижают ЭПР-стресс, восстанавливают чувствительность к лептину, вызванную ЭПР-стрессом [7, 8]. Результаты предыдущих исследований показали, что повышенный ЭПР-стресс и активация UPR ингибировали передачу сигналов рецептора лептина в гипоталамусе на моделях мышей с ожирением, а введение РВА значительно повышало чувствительность к лептину [8, 42]. Hosoi et al. [5] показали, что ЭПР-стресс заметно ингибировал индуцированное лептином фосфорилирование Stat3 в эмбриональных клетках почки и нейробластомы человека, но ЭПР-стресс не индуцировал SOCS3. Согласно их результатам, ЭПР-стресс вызывал устойчивость к лептину, и индуцированная ЭПР-стрессом устойчивость к лептину опосредовалась через RTP1B, а не через SOCS3. Более того, было также продемонстрировано, что РВА корректирует вызванную ЭПР-стрессом устойчивость к лептину [5]. В настоящем исследовании пониженные уровни SOCS3 в островках контрольной группы с ожирением были значительно восстановлены до нормального уровня у мышей с ожирением, получавших РВА, после обработки лептином. Известно, что при ожирении нарушается функция ЭПР, а химический шаперон РВА ингибирует ЭПР-стресс, повышая способность к фолдингу и транспортировке, а также восстанавливает клеточные механизмы. Это подтверждается нашими выводами об увеличении экспрессии белка SOCS3 у мышей с ожирением, получавших РВА. Основываясь на факте повышения чувствительности к лептину, наши результаты также предполагают, что РВА может увеличивать экспрессию SOCS3.

В заключении: ЭПР-стресс играет важную роль в патологии ожирения и способствует развитию связанной с ожирением резистентности к лептину. Химический шаперон РВА ослабляет ЭПР-стресс и потенциально может улучшить передачу сигналов лептина. Понимание основных механизмов, которые связывают ЭПР-стресс и ожирение, а также то, как РВА влияет на чувствительность к лептину, важно для лечения ожирения и связанных с ним расстройств. Следовательно, необходимы дальнейшие исследования, чтобы полностью понять эти механизмы.

**Финансирование.** Это исследование было поддержано Советом по научным и технологическим исследованиям Турции (TUBITAK) (проект № 114S830).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов в финансовой или иной сфере.

**Соблюдение этических норм.** В настоящем исследовании соблюдались все применимые международные, национальные и/или институциональные руководящие принципы по уходу и использованию животных. Исследование было проведено с одобрения Комитета по этике животных при Учебно-исследовательской больнице Йылдырым Беязит (Yildirim Beyazit Training and Research Hospital), Анкара, Турция (№ 2014/21).

**Дополнительные материалы.** Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте журнала «Biochemistry» (Moscow) (<http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>) и на сайте издательства Springer (<https://link.springer.com/journal/10541>), том 86, вып. 4, 2021.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fruhwürth, S., Vogel, H., Schürmann, A., and Williams, K. J. (2018) Novel insights into how overnutrition disrupts the hypothalamic actions of leptin, *Front. Endocrinol.*, **9**, 1-6, doi: 10.3389/fendo.2018.00089.
2. Thon, M., Hosoi, T., Yoshii, M., and Ozawa, K. (2014) Leptin induced GRP78 expression through the PI3K-mTOR pathway in neuronal cells, *Sci. Rep.*, **4**, 1-8, doi: 10.1038/srep07096.
3. Park, H. K., and Ahima, R. S. (2015) Physiology of leptin: energy homeostasis, neuroendocrine function and metabolism, *Metabolism*, **64**, 24-34, doi: 10.1016/j.metabol.2014.08.004.
4. Sáinz, N., Barrenetxe, J., Moreno-Aliaga, M. J., and Martínez, J. A. (2015) Leptin resistance and diet-induced obesity: central and peripheral actions of leptin, *Metabolism*, **64**, 35-46, doi: 10.1016/j.metabol.2014.10.015.
5. Hosoi, T., Sasaki, M., Miyahara, T., Hashimoto, C., Matsuo, S., et al. (2008) Endoplasmic reticulum stress induces leptin resistance, *Mol. Pharmacol.*, **74**, 1610-9, doi: 10.1124/mol.108.050070.
6. Yadav, A., Kataria, M. A., Saini, V., and Yadav, A. (2013) Role of leptin and adiponectin in insulin resistance, *Clin. Chim. Acta*, **417**, 80-84, doi: 10.1016/j.cca.2012.12.007.
7. Hosoi, T., and Ozawa, K. (2016) Possible pharmacological approach targeting endoplasmic reticulum stress to ameliorate leptin resistance in obesity, *Front. Endocrinol.*, **7**, 1-4, doi: 10.3389/fendo.2016.00059.
8. Ozcan, L., Ergin, A. S., Lu, A., Chung, J., Sarkar, S., et al. (2009) Endoplasmic reticulum stress plays a central role in development of leptin resistance, *Cell Metab.*, **9**, 35-51, doi: 10.1016/j.cmet.2008.12.004.
9. Zhang, K., and Kaufman, R. J. (2008) From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response, *Nature*, **454**, 455-462, doi: 10.1038/nature07203.
10. Sha, H., He, Y., Yang, L., and Qi, L. (2011) Stressed out about obesity: IRE1 $\alpha$ -XBP1 in metabolic disorders, *Trends*

- Endocrinol. Metab.*, **22**, 374-381, doi: 10.1016/j.tem.2011.05.002.
11. Park, S. W., and Ozcan, U. (2013) Potential for therapeutic manipulation of the UPR in disease, *Semin. Immunopathol.*, **35**, 351-373, doi: 10.1007/s00281-013-0370-z.
  12. Hotamisligil, G. (2010) Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease, *Cell*, **140**, 900-917, doi: 10.1016/j.cell.2010.02.034.
  13. Jäger, R., Bertrand, M. J., Gorman, A. M., Vandenabeele, P., and Samali, A. (2012) The unfolded protein response at the crossroads of cellular life and death during endoplasmic reticulum stress, *Biol. Cell*, **104**, 259-270, doi: 10.1111/boc.201100055.
  14. Bensellam, M., Laybutt, D. R., and Jonas, J. C. (2012) The molecular mechanisms of pancreatic  $\beta$ -cell glucotoxicity: recent findings and future research directions, *Mol. Cell. Endocrinol.*, **364**, 1-27, doi: 10.1016/j.mce.2012.08.003.
  15. Engin, F., and Hotamisligil, G. S. (2010) Restoring endoplasmic reticulum function by chemical chaperones: an emerging therapeutic approach for metabolic diseases, *Diab. Obes. Metab.*, **12**, 108-115, doi: 10.1111/j.1463-1326.2010.01282.x.
  16. Khan, S., and Wang, C. H. (2014) ER stress in adipocytes and insulin resistance: mechanisms and significance, *Mol. Med. Rep.*, **10**, 2234-2240, doi: 10.3892/mmr.2014.2532.
  17. Eizirik, D. L., Miani, M., and Cardozo, A. K. (2013) Signalling danger: endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in pancreatic islet inflammation, *Diabetologia*, **56**, 234-41, doi: 10.1007/s00125-012-2762-3.
  18. Lei, X., Bone, R. N., Ali, T., Wohltmann, M., Gai, Y., et al. (2013) Genetic modulation of islet  $\beta$ -cell iPLA<sub>2</sub> $\beta$  expression provides evidence for its impact on  $\beta$ -cell apoptosis and autophagy, *Islets*, **5**, 29-44, doi: 10.4161/isl.23758.
  19. Ozcan, U., Yilmaz, E., Ozcan, L., Furuhashi, M., Vaillancourt, E., et al. (2006) Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes, *Science*, **313**, 1137-1140, doi: 10.1126/science.1128294.
  20. Carter, J. D., Dula, S. B., Corbin, K. L., Wu, R., Nunemaker, C. S. (2009) A practical guide to rodent islet isolation and assessment, *Biol. Proceed. Online*, **11**, 3-31, doi: 10.1007/s12575-009-9021-0.
  21. Marroquí, L., Vieira, E., Gonzalez, A., Nadal, A., and Quesada, I. (2011) Leptin downregulates expression of the gene encoding glucagon in alphaTC1-9 cells and mouse islets, *Diabetologia*, **54**, 843-51, doi: 10.1007/s00125-010-2024-1.
  22. Pfaffl, M. W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic Acids Res.*, **29**, 2002-2007, doi: 10.1093/nar/29.9.e45.
  23. Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254, doi: 10.1006/abio.1976.9999.
  24. Liu, Y., Zhang, Y., Zhang, Y., Zhang, J., Liu, Y., et al. (2017) Obesity-induced endoplasmic reticulum stress suppresses nuclear factor- $\kappa$ B expression, *Mol. Cell. Biochem.*, **426**, 47-54, doi: 10.1007/s11010-016-2879-7.
  25. Ozcan, U., Cao, Q., Yilmaz, E., Lee, A. H., Iwakoshi, N. N., et al. (2004) Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes, *Science*, **306**, 457-461, doi: 10.1126/science.1103160.
  26. Basseri, S., Lhoták, S., Sharma, A. M., and Austin, R. C. (2009) The chemical chaperone 4-phenylbutyrate inhibits adipogenesis by modulating the unfolded protein response, *J. Lipid Res.*, **50**, 2486-501, doi: 10.1194/jlr.M900216-JLR200.
  27. Sreejayan, N., Dong, F., Kandadi, M. R., Yang, X., and Ren, J. (2008) Chromium alleviates glucose intolerance, insulin resistance, and hepatic ER stress in obese mice, *Obesity (Silver Spring)*, **16**, 1331-1337, doi: 10.1038/oby.2008.217.
  28. Engin, F., Yermalovich, A., Nguyen, T., Hummasti, S., Fu, W., et al. (2013) Restoration of the unfolded protein response in pancreatic  $\beta$  cells protects mice against type 1 diabetes, *Sci. Transl. Med.*, **5**, 1-14, doi: 10.1126/scitranslmed.3006534.
  29. Engin, F., Nguyen, T., Yermalovich, A., and Hotamisligil, G. S. (2014) Aberrant islet unfolded protein response in type 2 diabetes, *Sci. Rep.*, **4**, 1-6, doi: 10.1038/srep04054.
  30. Eizirik, D. L., Cardozo, A. K., and Cnop, M. (2008) The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus, *Endocr. Rev.*, **29**, 42-61, doi: 10.1210/er.2007-0015.
  31. Cnop, M., Foufelle, F., and Veloso, L. A. (2012) Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes, *Trends Mol. Med.*, **18**, 59-68, doi: 10.1016/j.molmed.2011.07.010.
  32. Cnop, M., Toivonen, S., Igoillo-Esteve, M., and Salpea, P. (2017) Endoplasmic reticulum stress and eIF2 $\alpha$  phosphorylation: the Achilles heel of pancreatic  $\beta$  cells, *Mol. Metab.*, **6**, 1024-1039, doi: 10.1016/j.molmet.2017.06.001.
  33. Hartman, M. G., Lu, D., Kim, M. L., Kociba, G. J., Shukri, T., et al. (2004) Role for activating transcription factor 3 in stress-induced  $\beta$ -cell apoptosis, *Mol. Cell. Biol.*, **24**, 5721-5732, doi: 10.1128/MCB.24.13.5721-5732.2004.
  34. Marhfour, I., Lopez, X. M., Lefkaditis, D., Salmon, I., Allagnat, F., et al. (2012) Expression of endoplasmic reticulum stress markers in the islets of patients with type 1 diabetes, *Diabetologia*, **55**, 2417-2420, doi: 10.1007/s00125-012-2604-3.
  35. Laybutt, D. R., Preston, A. M., Akerfeldt, M. C., Kench, J. G., Busch, A. K., et al. (2007) Endoplasmic reticulum stress contributes to beta cell apoptosis in type 2 diabetes, *Diabetologia*, **50**, 752-63, doi: 10.1007/s00125-006-0590-z.
  36. Matsuda, T., Kido, Y., Uchida, T., and Kasuga, M. (2008) Reduced insulin signaling and endoplasmic reticulum stress act synergistically to deteriorate pancreatic beta cell function, *Kobe J. Med. Sci.*, **54**, E114-E121.
  37. Elouil, H., Bensellam, M., Guiot, Y., Vander Mierde, D., Pascal, S. M., et al. (2007) Acute nutrient regulation of the unfolded protein response and integrated stress response in cultured rat pancreatic islets, *Diabetologia*, **50**, 1442-52, doi: 10.1007/s00125-007-0674-4.
  38. Syeda, K., Mohammed, A. M., Arora, D. K., and Kowluru, A. (2013) Glucotoxic conditions induce endoplasmic reticulum stress to cause caspase 3 mediated lamin B degradation in pancreatic  $\beta$ -cells: protection by nifedipine, *Biochem. Pharmacol.*, **86**, 1338-1346, doi: 10.1016/j.bcp.2013.08.023.
  39. Malo, A., Krüger, B., Göke, B., and Kubisch, C. H. (2013) 4-Phenylbutyric acid reduces endoplasmic reticulum stress, trypsin activation, and acinar cell apoptosis while increasing secretion in rat pancreatic acini, *Pancreas*, **42**, 92-101, doi: 10.1097/MPA.0b013e318259f6ca.
  40. Ye, Z., Liu, G., Guo, J., and Su, Z. (2018) Hypothalamic endoplasmic reticulum stress as a key mediator of obesity-induced leptin resistance, *Obes. Rev.*, **19**, 770-785, doi: 10.1111/obr.12673.
  41. Hosoi, T., Miyahara, T., Kayano, T., Yokoyama, S., and Ozawa, K. (2012) Fluvoxamine attenuated endoplasmic reticulum stress-induced leptin resistance, *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, **3**, 1-5, doi: 10.3389/fendo.2012.00012.
  42. Won, J. C., Jang, P. G., Namkoong, C., Koh, E. H., Kim, S. K., et al. (2009) Central administration of an endoplasmic reticulum stress inducer inhibits the anorexigenic effects of leptin and insulin, *Obesity*, **17**, 1861-1865, doi: 10.1038/oby.2009.194.

## CHEMICAL CHAPERONE PBA ATTENUATES ER STRESS AND UPREGULATES SOCS3 EXPRESSION AS A REGULATOR OF LEPTIN SIGNALING

**B. Baba<sup>1</sup>, M. Çalışkan<sup>2</sup>, G. Büyük<sup>3</sup>, and A. Hacışevki<sup>4\*</sup>**

<sup>1</sup> Department of Medical Biochemistry, Faculty of Medicine, Yüksek İhtisas University, 06520 Ankara, Turkey

<sup>2</sup> Department of Genetic, Gaziosmanpaşa Hospital, Yeni Yüzyıl University, 34245 Istanbul, Turkey

<sup>3</sup> Department of Physiology, Faculty of Medicine, Ankara Medipol University, 06050 Ankara, Turkey

<sup>4</sup> Department of Biochemistry, Faculty of Pharmacy, Gazi University, 06100 Ankara, Turkey; E-mail: abozkir@gazi.edu.tr

Endoplasmic reticulum (ER) is very sensitive to the nutritional and energy states of the cells. Disruption of ER homeostasis leads to the accumulation of unfolded/misfolded proteins in the ER lumen, which is defined as ER stress. ER stress triggers the unfolded protein response (UPR). It is suggested that chronic ER stress is associated with obesity and leptin resistance. We investigated the role of ER stress and the effect of the ER stress inhibitor phenylbutyric acid (PBA) of in obesity, as well as their impact on leptin signaling. This study involved twenty-four lean and twenty-four leptin-deficient (ob/ob) mice divided into PBA- and vehicle-treated groups. Pancreatic islets were isolated incubated with leptin for 48 h, and assayed for the expression of CHOP and XBP1s (UPR signaling indicators) and SOCS3 (regulator of leptin signaling) by RT-qPCR. The expression levels of XBP1s and CHOP were markedly increased in the ob/ob controls compared to other groups with and without leptin treatment. No significant differences in the XBP1s and CHOP expression levels were found between the PBA-treated ob/ob and lean mice. SOCS3 expression was significantly upregulated in the PBA-treated ob/ob mice compared to the ob/ob controls after leptin treatment; but no significant difference in the SOCS3 expression was found between the PBA-treated ob/ob and lean mice with and without leptin treatment. Our findings suggested that ER stress plays an important role in the pathology of obesity, while PBA reduces ER stress and may potentially ameliorate leptin signaling.

*Keywords:* chemical chaperone, endoplasmic reticulum stress, leptin signaling, obesity, phenylbutyric acid, unfolded protein response