

СИГНАЛИЗАЦИЯ И ГЕННАЯ ЭКСПРЕССИЯ В СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЕ ПРИ ДИАБЕТЕ 2 ТИПА: ТЕКУЩИЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ ШИРОКОЗАХВАТНЫХ ПОДХОДОВ

Обзор

© 2022 А.В. Воротников^{1,2*}, Д.В. Попов^{1,3*}, П.А. Махновский¹

¹ ФГБУН ГНЦ РФ Институт медико-биологических проблем РАН, 123007 Москва, Россия; электронная почта: a.vorotnikov@icloud.com, danil-popov@yandex.ru

² ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова Минздрава России, 121552 Москва, Россия

³ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет фундаментальной медицины, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 10.05.2022

После доработки 09.08.2022

Принята к публикации 10.08.2022

Скелетные мышцы вносят основной вклад в появление инсулинорезистентности и нарушение утилизации глюкозы из кровотока, развитие гипергликемии и диабета 2-го типа. Молекулярные механизмы регуляции захвата глюкозы мышечными клетками многообразны, включая инсулинозависимые как основные, но не единственные. Они задействуют большой спектр белков, которые контролируют внутриклеточный трафик и выход транспортеров глюкозы на поверхность клетки, формируя разветвленную регуляторную сеть. В обзоре подчеркивается преимущество широкозахватных подходов для поиска активируемых инсулином регуляторных белков и генов в скелетной мышце людей с разной степенью метаболических нарушений. Обсуждаются методические подходы для оценки метаболических нарушений и молекулярных ответов скелетной мышцы человека на инсулин. Анализируются известные молекулярные механизмы регуляции захвата глюкозы и первые результаты фосфопротеомных и транскриптомных исследований, раскрывших масштабную сеть мишеней инсулина в мышечных клетках. Эти результаты показывают, что формирование ясной картины тех изменений, которые происходят при развитии метаболических нарушений, требует системного и сочетанного анализа на разных уровнях регуляции, включая сигнальные системы, транскрипционные факторы и генную экспрессию. Такой анализ представляется перспективным для поиска неописанных ранее механизмов регуляции захвата глюкозы скелетной мышцей и выявления ключевых регуляторов, являющихся потенциальными мишенями новых терапевтических препаратов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: скелетная мышца, инсулинорезистентность, инсулиновая сигнализация, АМПК, захват глюкозы, фосфопротеом, транскриптом, сахарный диабет 2 типа.

DOI: 10.31857/S032097252209007X, **EDN:** BAWWXU

ВВЕДЕНИЕ

В большинстве развитых стран Европы от 15 до 25% взрослого населения страдает ожирением.

По прогнозам ВОЗ, к 2030 г. более 40% населения этих стран будет иметь избыточный вес. Ожирение служит основным фактором риска развития инсулинорезистентности (ИнсРез),

Принятые сокращения: ИнсРез – инсулинорезистентность; СД2Т – сахарный диабет 2-го типа; ТФ – транскрипционные факторы; Akt (АКТ – для белка человека) – киназа, кодируемая ретровирусным онкогеном из клеток линии АКТ-8, выведенной из Стока А линии к тимомы мышей AKR; АМПК – АМР-зависимая протеинкиназа; СаМК2 (САМК2 – для белка человека) – кальций/кальмодулин-зависимая киназа II-типа; СК1/2 – казеинкиназы I/II-типа; Glut4 (GLUT4 – для белка человека) – транспортер глюкозы 4-типа; GSV – везикулы хранения GLUT4; IFG – повышенный уровень глюкозы натощак; IGF-1 – инсулиноподобный фактор роста-1; IGT – нарушенная глюкозотолерантность; IRS – субстрат рецептора инсулина; mTOR (MTOR – для белка человека) – механистическая мишень рапамицина; TBC1D1 и TBC1D4 (AS160) – белки, содержащие TBC-домен.

* Адресат для корреспонденции.

ведущей к развитию гипергликемии и сахарного диабета 2-го типа (СД2Т), нарушению функций кровеносных сосудов, почек и зрения, сердечно-сосудистым и онкологическим осложнениям [1, 2]. Это подчеркивает системный и взаимосвязанный характер метаболических нарушений, накладывая определенные ограничения на их изучение непосредственно у человека. ИнсРез проявляется как снижение способности тканей захватывать глюкозу из кровотока в ответ на инсулин. С точки зрения регуляции уровня глюкозы в плазме крови, основными мишенями инсулина выступают печень, жир и скелетные мышцы. В норме скелетные мышцы составляют 30–40% от массы тела. Даже в покое на них приходится до 80% инсулинозависимого захвата глюкозы [3]. Это свидетельствует об исключительной роли скелетных мышц в развитии метаболических нарушений и подчеркивает важность изучения молекулярных механизмов развития ИнсРез именно в этой ткани.

Изучение различий метаболических параметров в биоптатах скелетных мышц людей с разной выраженностью метаболических нарушений позволяет обнаружить наиболее яркие изменения экспрессии и/или активности ферментов и сигнальных белков. Животные модели, включая нокаутных и трансгенных животных, позволяют расширить экспериментальные возможности и сопоставить динамику молекулярных и патофизиологических изменений [4, 5]. Однако накапливается все больше данных о различиях метаболизма грызунов и человека. Кроме того, животные крайне устойчивы к развитию СД2Т. В частности, у грызунов срок жизни слишком короткий для достижения конечных стадий СД2Т. Поэтому результаты, полученные на животных моделях, следует с осторожностью переносить на человека [6]. Наконец, клеточные модели крайне полезны для изучения динамики внутриклеточных реакций, в том числе сигнальных на инсулин и другие стимулы [7, 8]. Они удобны для моделирования отдельных стадий патогенеза СД2Т (например, гиперлипидемии, гиперинсулинемии или гипергликемии) [9–11] и для выяснения эпигенетических изменений, происходящих при ожирении и СД2Т [12–15].

В последнее время стало ясно, что инсулин активирует в клетках большой набор сигнальных молекул, объединенных в единую сеть [7, 8]. Стал очевиден масштабный характер молекулярных изменений, сопровождающих появление и прогрессию ИнсРез и СД2Т [16, 17]. Для изучения многокомпонентных сигнальных клеточных систем все большую значимость приобретают широкозахватные методы. Они

позволяют одновременно регистрировать тысячи молекулярных событий, связанных с изменением содержания белков и метаболитов, их модификаций, генной экспрессии, эпигенома и метаболома. Комплексная биоинформатическая обработка таких «больших» данных позволяет предположить причинно-следственные связи и обозначить ключевые молекулярные механизмы и регуляторы, изменение функций которых может быть связано с развитием метаболических нарушений.

Данный обзор сфокусирован на результаты пока немногочисленных работ, в которых была предпринята попытка связать системные нарушения метаболизма с молекулярными изменениями в скелетных мышцах у человека и животных. Для этого сначала обсуждаются подходы для оценки системной ИнсРез и сравнительного анализа изменений, ассоциированных с развитием ИнсРез и СД2Т. Чтобы высветить их масштабный характер даже на конечном, молекулярном уровне, далее кратко рассмотрены внутриклеточные механизмы регуляции захвата глюкозы клетками. Наконец, обсуждаются имеющиеся результаты и перспективы широкозахватных методик для получения комплексной картины тех изменений, которые могут позволить выявить значимые терапевтические мишени.

СПОСОБЫ ОЦЕНКИ СИСТЕМНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ МЕТАБОЛИЗМА

До сих пор нет четкой картины молекулярных изменений, в том числе в скелетной мышце, при развитии СД2Т. Это связано с тем, что они многочисленны и взаимосвязаны, но не происходят дискретно, а развиваются долго и неоднородно, в соответствии с индивидуальными особенностями человека. Изучение их динамики предполагает анализ биопсийного материала добровольцев, стратифицированных по степени развитости метаболических нарушений. Для этого, по данным обширных клинических наблюдений, были определены и общеприняты референсные показатели [18–20]. Ими служат уровень инсулина или глюкозы в плазме крови натощак (т.е. до начала глюкозотолерантного теста), уровень глюкозы в крови через 2 ч после начала глюкозотолерантного теста и уровень гликированного гемоглобина (A1C) в крови натощак. Стратификация пациентов происходит на основе этих показателей или их сочетаний (см. ниже).

Ожирение, связанное с накоплением преимущественно висцерального жира, является

основным фактором риска развития метаболических нарушений, ИнсРез и СД2Т [18]. Это состояние связано с хроническим чрезмерным потреблением пищи (так называемая «западная диета») и снижением энергозатрат из-за малоактивного образа жизни. На ранней фазе клинические проявления метаболических нарушений, как правило, отсутствуют [21, 22]. Прогрессирующее ожирение ведет к нарушению жирового обмена, развитию воспаления в жировой ткани и дисфункции адипоцитов [23, 24]. В том числе снижается секреция адипонектина, который увеличивает чувствительность клеток к инсулину, а секреция провоспалительных цитокинов и липолиз в жировой ткани усиливаются. В результате уровень свободных жирных кислот и липопротеидных триглицеридов в плазме крови повышается, приводя к накоплению эктопического жира в других тканях, в том числе в скелетных мышцах [21, 25, 26]. Считается, что эти факторы являются основными триггерами ИнсРез в скелетных мышцах [16, 27].

ИнсРез может развиваться в скрытой форме годами без видимых клинических проявлений. Это связано с тем, что повышенная секреция инсулина компенсирует ослабление клеточных реакций, поддерживая углеводный и жировой обмен на нужном уровне [22]. Первые признаки некомпенсированной ИнсРез проявляются как небольшое повышение уровня глюкозы в крови натощак от 5,6 до 7,8 мМ (IFG, impaired fasting glucose) и/или как системное нарушение толерантности к глюкозе (IGT, impaired glucose tolerance) [18–20] (рис. 1, а и б). Индивидуальное или сочетанное проявление этих параметров отражает гетерогенность патогенеза СД2Т и тоже может использоваться при стратификации пациентов [19]. IGT определяют с помощью глюкозотолерантного теста как повышенное содержание глюкозы (7,8–11 мМ) в крови через 2 ч после принятия раствора 75 г глюкозы натощак [18]. В состоянии предиабета уровень инсулина в крови натощак повышен лишь иногда, но он всегда выше в ответ на нагрузку глюкозой (рис. 1, а и в). Таким образом, IFG отражает наличие дефектов как инсулинзависимых, так и независимых механизмов поглощения глюкозы тканями натощак [28], тогда как IGT отражает нарушения захвата глюкозы тканями в ответ на стимуляцию эндогенным инсулином.

СД2Т характеризуется устойчивым повышением уровня глюкозы натощак (>7 мМ) и через 2 ч после начала глюкозотолерантного теста (>11 мМ) (рис. 1, а и б) [18]. На ранних стадиях СД2Т уровень инсулина в крови натощак

зачастую повышен (>9 мкМЕ/мл), но пиковая концентрация инсулина в крови не изменяется в процессе глюкозотолерантного теста и падает на поздних стадиях заболевания (рис. 1, в). Это связано с прогрессирующей дисфункцией панкреатических β -клеток и нарушением секреции инсулина. В результате инсулинзависимые ткани снижают захват глюкозы из крови после приема пищи, и развивается устойчивая гипергликемия. На этом этапе патология СД2Т становится практически необратимой, соединяя в себе основные черты диабета типов 1 и 2, и лечение становится симптоматическим.

Отсутствие клинически релевантных маркеров молекулярных изменений в скелетной мышце при ИнсРез и маркеров степени дисфункции β -клеток затрудняет определение стадий заболевания и стратификацию пациентов для получения биопсийного материала и интерпретации результатов его сравнительного анализа. Для решения этой проблемы используются референсные значения глюкозы и инсулина крови, полученные в глюкозотолерантном тесте (рис. 1, а). Они позволяют унифицировать группы сравнения испытуемых [18] и получать результаты на больших выборках [19, 20].

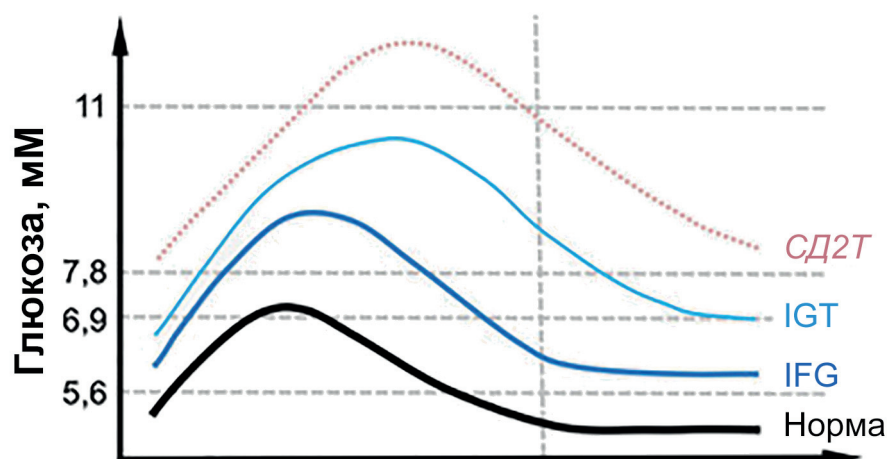
Глюкозотолерантный тест достаточно прост, и поэтому рутинно используется для определения показателей углеводного обмена (в т.ч. IFG и IGT). Он отражает исходное состояние (натощак) и системную реакцию организма (изменение уровня глюкозы в плазме крови) на прирост эндогенного инсулина. Поскольку последний сам по себе зависит от степени выраженности патологии, количественная оценка чувствительности к инсулину с помощью глюкозотолерантного теста невозможна. Важно отметить, что в этом тесте для всех людей используется стандартная доза глюкозы (75 г), что затрудняет сопоставление и интерпретацию результатов для людей, значительно различающихся по массе тела.

Для количественной оценки системной ИнсРез в качестве «золотого стандарта» используется гиперинсулинемический эугликемический клэмп-тест [29]. В кровь одновременно вводят инсулин и глюкозу, подбирая скорость подачи инсулина так, чтобы его уровень (100 мкМЕ/мл) был сопоставим с максимальным физиологическим уровнем при приеме пищи. При этом скорость введения глюкозы подбирается так, чтобы поддерживать ее уровень в крови постоянным. Через 2–3 ч удается достичь равновесия между скоростью введения и утилизации глюкозы тканями. Этот баланс поддерживается в течение 1–2 ч, и по количеству введенной (и утилизированной) за это

а

		Индекс массы тела, кг/м ²	Глюкоза натощак, мМ	Глюкоза через 2 ч теста, мМ
Норма		18,5-24,9	<5,6	<7,8
Предиабет	IFG	≥25	5,6-6,9	<7,8
	IGT	≥25	5,6-6,9	7,8-11
СД2Т		>>25	≥7	≥11

б



в

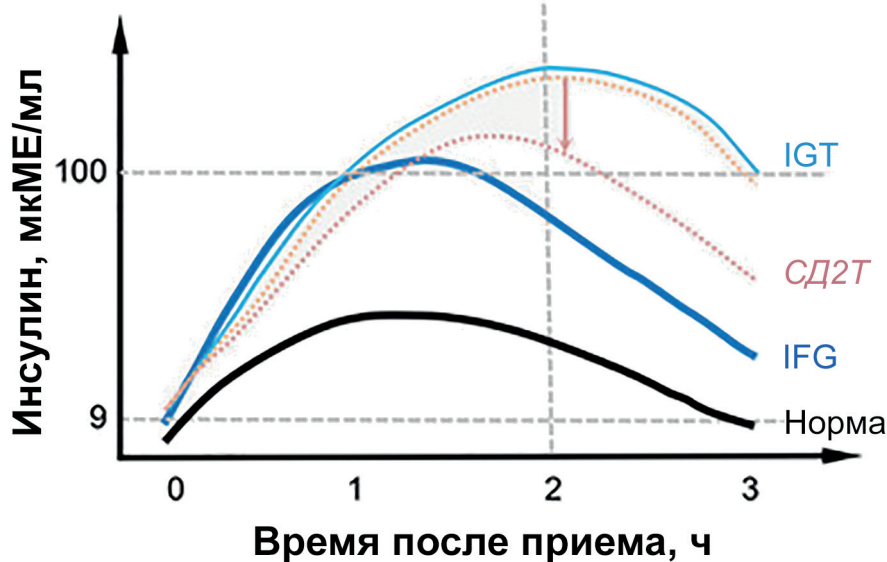


Рис. 1. Референсные значения (а) и изменения уровня глюкозы (б) и инсулина (в) в крови при глюкозотолерантном тесте, стандартно используемые для оценки степени выраженности нарушений углеводного обмена. Зависимости (б) и (в) обобщены по результатам измерений у более чем 5000 добровольцев [20]. В таблице и на оси ординат графиков отмечены референсные значения показателей для определения повышенного уровня глюкозы в крови натощак (IFG), системного нарушения толерантности к глюкозе (IGT) и сахарного диабета 2-го типа (СД2Т). Стрелка отражает сдвиг показателя при длительном течении СД2Т. Уровень инсулина традиционно выражен в международных единицах (миллиэквивалентах, МЕ), количественно отражающих терапевтическое действие инсулина без учета его молекулярной массы (в). Одна единица инсулина эквивалентна 0,0347 мг инсулина, а 100 мкМЕ/мл соответствует концентрации 0,6 пкМ инсулина. С цветными вариантами рис. 1–3 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistrymoscow.com>)

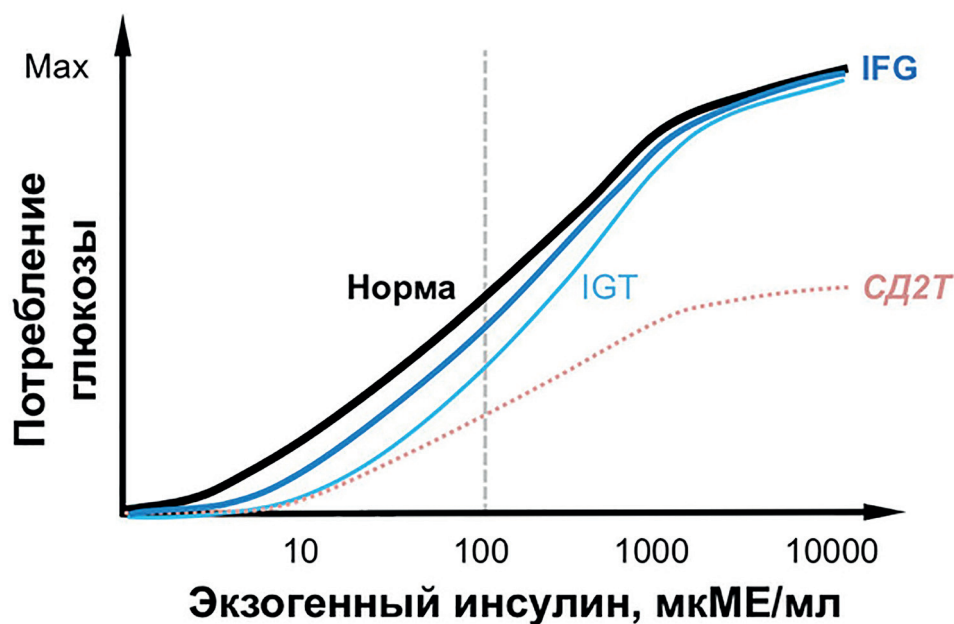


Рис. 2. Изменения зависимости скорости утилизации глюкозы от концентрации экзогенного инсулина на разных стадиях развития ИнсРез и СД2Т. Схематически представлены обобщенные результаты нескольких эугликемических клэмп-тестов с использованием разных равновесных концентраций инсулина [30]. Вертикальная линия соответствует используемой в стандартном клэмп-тесте равновесной концентрации инсулина 100 мкМЕ/мл. Сокращения как на рис. 1

время глюкозы рассчитывается М-индекс системной чувствительности к инсулину. Использование нескольких таких тестов с различной целевой концентрацией инсулина позволило оценить зависимость «концентрация инсулина – потребление глюкозы» [30] (рис. 2). При развитии ИнсРез эта зависимость сдвигается вправо, отражая снижение чувствительности тканей к инсулину (наличие IFG и/или IGT). На поздних стадиях СД2Т снижается не только чувствительность, но и отклик (максимальная реакция на инсулин), отражая дисфункцию β -клеток. Зависимость, показанная на рис. 2, сдвигается вправо и вниз.

Снижение системной чувствительности к инсулину, определяемое с помощью стандартного гиперинсулинемического эугликемического клэмп-теста, отражает снижение утилизации глюкозы тканями при наиболее показательной концентрации инсулина в крови – 100 мкМЕ/мл (вертикальный пунктир на рис. 2). Вместе с тем этот тест не позволяет оценить ни максимальный отклик на инсулин, ни реакцию на его разовое введение. Во время клэмп-теста высокий уровень инсулина поддерживается долгое время, после чего обычно берется проба ткани. У здоровых людей и даже у людей с ИнсРез такого продолжительного и выраженного (~100 мкМЕ/мл) увеличения инсулина в крови после приема пищи не наблюдается [22]. Поэтому изменения внутриклеточной сигнализации и генной экспрессии

после клэмп-теста следует интерпретировать с осторожностью. Кроме того, клеточные исследования показали, что инсулин вызывает быстрые (несколько минут) и динамично меняющиеся сигнальные реакции [7, 12, 13, 31, 32], тогда как достижение стационарных условий в клэмп-тесте требует значительного времени. Это значит, что клэмп-тест не идеален для изучения полного спектра молекулярных ответов скелетной мышцы на инсулин.

Альтернативой для изучения молекулярных ответов на инсулин *in vivo* является их измерение в условиях, максимально приближенных к естественным, например, после приема пищи, нормированной на массу тела или основной обмен [22]. Подобный подход был использован для исследования суточных изменений фосфопротеома скелетных мышц у грызунов [33]. Представляется, что он перспективен и для людей при использовании приема глюкозы или смешанной пищи, нормированной на массу тела или основной обмен. У людей с ожирением секреция инсулина после приема пищи значительно выше, что объясняется не только наличием ИнсРез, но и большей массой съеданной пищи. Поэтому такая нормировка позволяет сильнее отразить различия в молекулярных ответах мышцы на инсулин у людей с ИнсРез и нормальным метаболизмом. Этот подход до сих пор не был использован для исследования молекулярных ответов в скелетной мышце человека.

МНОЖЕСТВЕННОСТЬ МЕХАНИЗМОВ РЕГУЛЯЦИИ ЗАХВАТА ГЛЮКОЗЫ

Молекулярные механизмы возникновения ИнсРез связывают с нарушением внутриклеточной регуляции захвата глюкозы мышечными и жировыми клетками [34]. Дефекты могут касаться непосредственных регуляторов транспорта глюкозы [27, 35] и быть чувствительны к контролирующим их активностью сигнальным молекулам разных каскадов, включая инсулиновый [16, 17] и другие каскады [36]. Эти нарушения также плотно связаны с дисбалансом метаболических потоков при ожирении [23, 25, 27]. Активация захвата глюкозы происходит в несколько стадий, каждая из которых требует своих регуляторов, действующих комбинаторно на разных этапах [37–39]. В состоянии покоя основной инсулинозависимый транспортер глюкозы GLUT4 находится в клетке в специальных везикулах хранения (Glut4 storage vesicles, GSV) [40]. Это стационарные везикулы, удерживаемые в цитозоле и освобождающиеся после связывания набора регуляторов [37]. После этого они перемещаются на периферию, проходят сквозь сеть кортикального

цитоскелета, подстилающего мембрану клетки, позиционируются по отношению к ней и сливаются, экспонируя на поверхность функциональный GLUT4 (рис. 3). Пока нет однозначного понимания, с какими из этих молекул связаны нарушения, возникающие при ИнсРез и СД2Т. Это могут быть и элементы сигнальных каскадов, и их конечные мишени, непосредственно регулирующие перемещение и экспозицию транспортеров глюкозы на поверхность клетки, и их комбинации.

Канонический инсулиновый каскад (рецептор → белок IRS → PI3-киназа → Akt → белок TBC1D4 (AS160) → GTPаза Rab → GLUT4) рассматривается как основной механизм сигнальной активации захвата глюкозы инсулином у животных и человека (рис. 3). Он регулирует преимущественно транслокацию GSV к периферии клетки с участием GAP-белков TBC1D4 (он же AS160) и GTPаз Rab8а и Rab13 (в мышечных клетках) или Rab10 (в адипоцитах) [38, 39]. Однако есть уже много данных о том, что у людей с системной ИнсРез активность этого каскада, измеренная на уровне киназы Akt, снижена не всегда или существенно меньше, чем инсулинозависимый захват глюкозы [27, 41, 42].

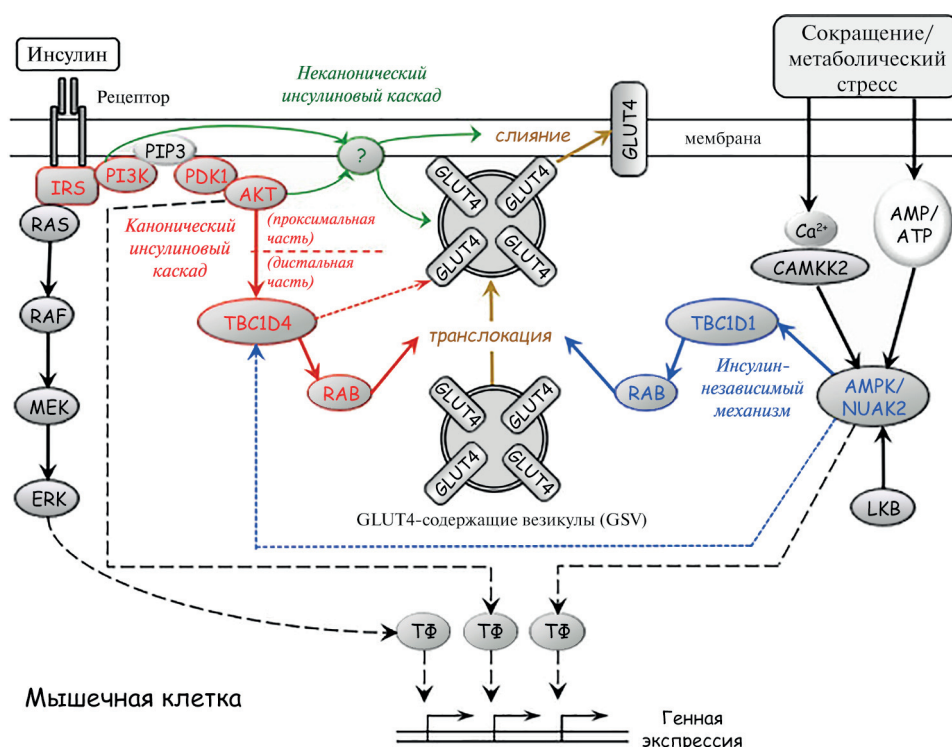


Рис. 3. Сигнальные механизмы регуляции захвата глюкозы с участием транспортера GLUT4 в мышечной клетке. В дополнение к каноническому инсулиновому каскаду (выделен *красным*), преимущественно регулирующему переход GLUT4-содержащих везикул из цитозоля к клеточной мембране, условный неканонический инсулиновый каскад (показан *зеленым*) регулирует подход, позиционирование и слияние этих везикул с мембраной, обеспечивая экспозицию GLUT4 на поверхности клетки. Инсулиннезависимый механизм с участием AMPK/NUAK2 (выделен *синим*) отвечает за экспозицию GLUT4 и захват глюкозы в ответ на сокращение и возрастание уровня AMP в клетке. Пунктирные линии показывают сопряжение этих каскадов с активацией транскрипционных факторов (ТФ) и генной экспрессии

Этот феномен может быть связан с несколькими причинами. Во-первых, основные нарушения внутри канонического инсулинового каскада могут происходить в его дистальной части, ниже Akt [27]. Во-вторых, они могут быть связаны с самими регуляторами активации GSV в примембранном компартменте [38] или экзоцитоза везикул [39], находящихся под контролем ветвей канонического каскада или других путей передачи сигнала от рецептора инсулина, совокупно представленных как условный неканонический инсулиновый каскад на рис. 3. Наконец, дополнительная активация Akt может достигаться за счет других рецепторов, связанных с PI3-киназным каскадом, но не передающих сигнал к GSV. В этом плане может заслуживать внимания преимущественная роль изоформы Akt2 в регуляции захвата глюкозы [43]. Вопрос о том, могут ли разные рецепторы, например инсулина и инсулиноподобного фактора роста (IGF-1), по-разному активировать Akt1 и Akt2 остается открытым.

Необходимость одновременного участия нескольких разных регуляторов на каждой стадии трафика GSV, различие механизмов их активации и комбинаторный характер их действия придают регуляции трафика GSV сложную сетевую структуру. В совокупном виде она условно показана как неканонический инсулиновый каскад на рис. 3. Хотя его детализация выходит за рамки данного обзора и описана в ряде обзоров [35, 37–40], здесь стоит отметить два механизма. Оба механизма необходимы, поскольку регулируют экспозицию транспортеров глюкозы независимо от Akt и дистальной части канонического инсулинового каскада. Один – активация малой GTPазы Rac1 под действием PI3-киназы; Rac1 вызывает перестройку кортикального цитоскелета и обеспечивает подход GSV к мембране клетки. Другой механизм запускается непосредственно от рецептора инсулина, требует ионов Ca^{2+} и задействует классический комплекс белков SNARE, обеспечивающих слияние GSV с плазматической мембраной и выход транспортеров на поверхность клетки.

Многие регуляторы везикулярного трафика, в том числе TBC1D4/AS160 и GTPазы Rab, регулируют не только какой-то один этап трафика, но и критичны для прохождения других этапов, действуя в комбинации с другими регуляторами. Таким образом, экспозиция транспортеров и захват глюкозы находятся под множественным контролем как канонических, так и неканонических мишеней инсулина, которые пока далеко не все известны [35]. Возможно, что снижение чувствительности захвата глюкозы к

инсулину связано не только с одной из них, а с скоординированными изменениями группы таких мишеней.

Альтернативные механизмы могут регулировать гомеостаз глюкозы натощак (когда уровень инсулина очень низок) и особенно в ответ на сократительную (физическую) активность. Они включают АМР-зависимую протеинкиназу (АМРК) [44] и родственные киназы (рис. 3). Последние образуют группу из 12 ферментов [45], функции которых пока мало понятны. Однако по крайней мере два из них, АМРК-подобные киназы NUAK1 [46] и NUAK2 [47], участвуют в регуляции уровня глюкозы в крови. Как и АМРК, NUAK2 формирует независимый от инсулина механизм регуляции захвата глюкозы с участием АМР и киназы LKB1. В отличие от инсулинового, этот механизм преимущественно опосредован малой GTPазой Rab14 и ее регулятором TBC1D1 [38]. Значимость альтернативных механизмов подтверждается тем, что избирательный для скелетной мышцы нокаут генов, кодирующих рецепторы к инсулину и IGF-1 [48], или изоформ Akt1/2 [49], или сверхэкспрессия Akt2 в скелетной мышце [33] не изменяли чувствительности к инсулину у мышей, в том числе после высокожировой диеты [33], а также тем, что активность АМРК возрастает при физической нагрузке и улучшает захват глюкозы мышцами из кровотока [28], но снижена у людей с ожирением и ИнсРез [50, 51].

Наличие нескольких механизмов регуляции трафика Glut4 и захвата глюкозы в скелетных мышцах значительно расширяет список сигнальных белков, нарушение активности которых может вызывать ИнсРез. Они представляют не только фундаментальный интерес, но и потенциальные мишени антидиабетических препаратов. Изменения активности этих белков у людей с ожирением, ИнсРез или СД2Т могут быть вызваны как изменением их посттрансляционных модификаций (главным образом фосфорилирования), так и изменением содержания в клетке. Учитывая длительность развития ИнсРез и многообразие участников, логично предположить, что нарушения их активности связаны с изменениями активности ряда транскрипционных факторов (ТФ) и генной экспрессии (рис. 3), закрепляющими состояние ИнсРез и последующий диабетический фенотип.

ИЗМЕНЕНИЯ ПРОТЕОМА СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ ПРИ ИнсРез и СД2Т

Считается, что в каждой ткани экспрессируется до 10 000 белков, без учета их изоформ [52].

В пробах скелетной мышцы редко удается детектировать даже треть от общего количества всех белков и это главным образом высококопийные белки. Наличие высокопредставленных саркомерных белков значительно ограничивает глубину протеомного масс-спектрометрического анализа.

Протеом скелетных мышц людей с метаболическими нарушениями изучался в ряде работ. Наиболее глубокий анализ позволил оценить изменения содержания более 2000 белков у 148 добровольцев (здоровые, пациенты с ИнсРез, без или с СД2Т) [53]. Если только менее 100 белков изменили экспрессию при ИнсРез, то гораздо более масштабные изменения были обнаружены у пациентов с СД2Т. Из более чем 400 белков, которые изменили содержание, только несколько его увеличили. Снизил содержание многие митохондриальные ферменты и транспортеры, регуляторы метаболизма аминокислот, синтеза белка (киназа МТОР (механистическая мишень рапамицина), фактор элонгации 2, белки рибосом), протеосомальные белки и белки теплового шока, а также ряд киназ (киназа легких цепей миозина SPEG, САМК2G, МАРК12 и др.). Увеличили содержание главным образом саркомерные белки, характерные преимущественно для быстрых мышечных волокон (изоформы тяжелых и легких цепей миозина, тропонина, тропомиозина). Интересно, что изменения в содержании белков при СД2Т частично совпали с изменениями уровня их фосфорилирования (см. ниже). Однако протеомный анализ не позволяет предположить механизмы возникновения этих изменений, указывая на важность более детального анализа транскриптома и посттрансляционных модификаций, особенно фосфопротеома.

ИЗМЕНЕНИЯ ФОСФОПРОТЕОМА СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ ПРИ ИнсРез и СД2Т

Фосфорилирование является одним из основных способов передачи сигнала в клетке. Существуют сотни киназ, каждая из которых может фосфорилировать несколько субстратов, и общее число сайтов фосфорилирования может достигать 100 000 [54]. Иммуноблоттинг позволяет оценить лишь порядка 10 разных сайтов фосфорилирования в одном исследовании, что определяется доступностью и специфичностью антител. Напротив, фосфопротеомный масс-спектрометрический анализ позволяет одновременно детектировать более 10 000 различных фосфосайтов в составе нескольких тысяч различных белков и на основании этих

данных предсказывать изменение активности фосфорилирующих их киназ. В пробах скелетных мышц в основном детектируются фосфосайты высокопредставленных мышечных белков, но фосфосайты низкокопийных белков удается детектировать гораздо реже. Однако именно они составляют большинство киназ и регуляторных белков. Считается, что даже современные фосфопротеомные методики позволяют детектировать лишь около 10% всех фосфосайтов [54]. Тем не менее фосфопротеомный анализ позволяет гораздо шире охватить изменения спектра фосфорилирования многих белков скелетных мышц, вызванные ИнсРез или СД2Т, как в базальном состоянии (натощак), так и в ответ на инсулин.

Базальное состояние. В скелетных мышцах людей с СД2Т не было выявлено серьезных отличий от здоровых людей в базальном уровне фосфорилирования белков канонического инсулинового каскада (в состоянии натощак) ни методом иммуноблоттинга [55–64], ни с помощью целевой масс-спектрометрии [65]. Другие масс-спектрометрические исследования показали лишь небольшие изменения отдельных фосфосайтов в проксимальной (IRS1) [66] и дистальной (TBC1D4) [53] частях каскада. Отсутствие выраженных изменений в инсулиновом каскаде в базальном состоянии при СД2Т согласуется с результатами, полученными для скелетной мышцы крыс после нескольких недель высокожировой диеты, моделирующей ИнсРез [33, 67].

С другой стороны, фосфопротеомное исследование с участием 148 человек с разной степенью метаболических нарушений показало, что в базальном состоянии наблюдаются прогрессирующие изменения при ИнсРез (IFG или IGT) и СД2Т [53]. Преимущественно снижалась активность киназ (оцениваемая по изменению уровня фосфорилирования их субстратов), не входящих в инсулиновый каскад. В том числе это киназы семейства РКС, казеинкиназы СК1/2, кальций/кальмодулин-зависимая киназа II-типа (САМК2), циклин-зависимые киназы CDK, киназа, связанная с миотонической дистрофией (DMPK), CDC2-подобная киназа двойной специфичности, митоген-активируемые киназы (МАР-киназы, МАРК) и другие. Также наблюдались изменения фосфорилирования сократительных и структурных белков (изоформы тяжелых цепей миозина, тропонин, небулин, титин, десмин и др.). Если связь метаболических нарушений с РКС ожидаема [16], то участие казеинкиназы типа I/II (СК1/2) достаточно неожиданно. СК1/2 фосфорилируют сотни субстратов [54], выполняя множество функций,

в частности, фосфорилируя гликогенсинтазу и регулируя обмен гликогена [68]. Эти данные по фосфопротеому человека [53] согласуются с результатами после высокожировой диеты у грызунов [33, 67], дополнительно обнаружившими влияние высокожировой диеты на фосфорилирование белков-регуляторов жирового обмена, воспаления и деградации белков.

Суммируя, влияние ИнсРез и СД2Т на базальный фосфопротеом скелетной мышцы (натошак) остается малоизученным. По имеющимся данным, выраженных изменений в базальной активности канонического инсулинового каскада при СД2Т не происходит. Это дает основание предполагать, что такие изменения отсутствуют и при ИнсРез, а основные различия между здоровыми людьми и пациентами с СД2Т, скорее всего, связаны с реакцией на инсулин. Кроме того, при СД2Т в скелетных мышцах происходят достаточно масштабные изменения фосфорилирования многих других сигнальных белков, принимающих участие в регуляции углеводно-жирового и белкового обмена и воспалительных реакций, которые прямо не связаны с каноническим инсулиновым каскадом, по крайней мере, с его проксимальной частью.

Стимуляция инсулином. Гиперинсулинемический эугликемический клэмп-тест наиболее популярен в исследованиях молекулярных ответов скелетной мышцы человека на инсулин. Как правило, в этом тесте концентрация инсулина в крови поддерживается достаточно высокой (~100 мкМЕ/мл) на протяжении нескольких часов. Как и ожидалось, ряд исследований выявил меньший прирост уровня фосфорилирования и/или активности белков канонического инсулинового каскада у людей с СД2Т по сравнению со здоровым контролем [55–62]. Однако в других работах различий обнаружено не было [63, 64, 69]. Фосфопротеомный анализ с помощью целевой масс-спектрометрии выявил относительно небольшие изменения уровня фосфорилирования лишь в нескольких из двух десятков сайтов IRS1 через 0,5, 1 и 4 ч клэмп-теста в мышце людей с СД2Т по сравнению со здоровыми добровольцами [65, 66].

Панорамный фосфопротеомный анализ скелетной мышцы здоровых людей после 2 ч стимуляции инсулином в процессе клэмп-теста показал изменение фосфорилирования ~700 фосфосайтов в более чем 400 белках. Преимущественно изменения наблюдались в сигнальных каскадах киназ АКТ, МТОР и МАРК, а также различных ТФ [70]. Поскольку эти молекулы являются мишенями инсулина, такой результат вполне ожидаем. Исследований,

сопоставлявших влияние инсулина на фосфопротеом скелетной мышцы людей без или с ИнсРез, или с СД2Т мы не обнаружили.

Фосфопротеом скелетной мышцы крыс в период ночной активности, когда животные активно питаются, был сопоставлен с таковым в период дневного отдыха [33]. У животных на жировой диете прирост инсулина после приема пищи был более чем в 2 раза выше, чем у контрольных (что говорит о наличии ИнсРез), но фосфорилирование белков канонического инсулинового каскада сильно не различалось. Это говорит о том, что снижение чувствительности к инсулину при высокожировой диете успешно компенсируется повышенной секрецией инсулина.

Таким образом, только часть исследований обнаружила при метаболических нарушениях отдельные, не всегда ярко выраженные и воспроизводимые, нарушения активации белков канонического инсулинового каскада инсулином в скелетной мышце. Это подтолкнуло к анализу зависимости уровня фосфорилирования этих белков от концентрации инсулина. Оказалось, что в адипоцитах даже малое увеличение фосфорилирования ключевой киназы проксимальной части каскада (Akt) было достаточным для полной активации дистальных элементов (например, Glut4 или транскрипционного фактора Foxo1) [41, 42]. Была выдвинута гипотеза об «избыточности» в клетке молекул проксимальной части каскада (рецептор инсулина, IRS, PI3-киназа и Akt), которые селективно передают сигнал в направлении других, менее представленных, мишеней [27]. Эта гипотеза позволяет объяснить, почему основные нарушения, связанные с ИнсРез, происходят и должны быть более выражены в дистальной части каскада на уровне регуляторов транслокации GSV, но не в проксимальной части, где их обычно ищут и не всегда находят. При этом конкретный механизм «дистальных» нарушений остается пока неизвестным [27].

В упомянутой выше модели [33] повышение эндогенного инсулина в ответ на прием пищи вызывало масштабные изменения фосфорилирования более 2500 сайтов белков в скелетной мышце контрольных крыс и животных на высокожировой диете. Несмотря на разный уровень инсулина у животных этих двух групп, относительное повышение уровня фосфорилирования Akt, mTOR и p70S6K1 (все – мишени инсулина) и снижение уровня фосфорилирования PKA были сходными. Различия наблюдались только в белках-регуляторах метаболизма гликогена. Масштабные межгрупповые различия возникали также после приема пищи и в

степени фосфорилирования ~3000 сайтов белков. Биоинформатический анализ предсказал, что у животных с метаболическими нарушениями активируются киназы СаМК2, рибосомальные киназы p70S6K1 и p90S6K, но снижается активность казеинкиназы СК2 [33]. Поскольку в скелетной мышце людей с СД2Т базальная активность СК2 тоже снижена и активность САМК2 изменена [53], эти результаты указывают на роль СК2 и САМК2 в изменениях внутриклеточной сигнализации в скелетной мышце при развитии ИнсРез и, возможно, СД2Т.

Таким образом, изменения фосфопротеома скелетной мышцы, происходящие при стимуляции инсулином, значительно отличаются в условиях ИнсРез и СД2Т по сравнению со здоровым контролем. Одно из возможных объяснений состоит в том, что при ИнсРез инсулин может связываться с рецепторами IGF-1 и гибридными рецепторами IGF-1/инсулина [71]. Сродство инсулина к этим рецепторам на порядок ниже, чем у IGF-1, и в норме инсулин их не активирует. Однако при компенсаторной гиперинсулинемии в условиях ИнсРез уровень инсулина длительно повышен и вероятность активации рецепторов IGF-1 и гибридных рецепторов возрастает [72]. Уровень IGF-1 также растет в этих условиях, пока уровень глюкозы в крови остается нормальным, но стабилизируется при IFG и падает при СД2Т, тогда как содержание гибридных рецепторов в скелетной мышце растет при ожирении, коррелируя с индексом массы тела [71]. Несмотря на то что все эти рецепторы активируют те же проксимальные звенья каскадов (PI3-киназа → Akt и MAP-киназы (Erk); см. рис. 3), дистальные звенья могут быть не идентичны, вызывая разные сигнальные ответы [73]. Насколько велики эти различия остается вопросом, но масштабность изменений фосфопротеома при ИнсРез предполагает, что они не единичны и лишь могут вносить определенный вклад.

Суммируя, нарушения активации инсулином компонентов канонического инсулинового каскада обнаруживаются далеко не всегда при ИнсРез и СД2Т. Это может быть связано с тем, что основные нарушения происходят в дистальной части каскада, на уровне низкопредставленных регуляторов везикулярного транспорта, в неканонических или других механизмах, регулирующих захват глюкозы. Влияние ИнсРез и СД2Т на фосфопротеом скелетной мышцы при стимуляции инсулином остается практически не изученным. Единственное исследование, изучавшее ответ на эндогенный инсулин после приема пищи в скелетной мышце грызунов в модели с высокожировой диетой, показало,

что изменения фосфопротеома, связанные с ИнсРез, выходят далеко за пределы канонического инсулинового каскада и связаны, в частности, с изменением активности СаМК2, рибосомальных S6-киназ p70S6K1 и p90S6K, а также СК2 [33]. Другие мишени по-прежнему требуют идентификации и подтверждения, по крайней мере, в разных моделях.

ИЗМЕНЕНИЯ ТРАНСКРИПТОМА СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ ПРИ ИнсРез и СД2Т

При метаболических нарушениях в скелетной мышце наблюдается изменение уровня фосфорилирования множества киназ как в базальном состоянии [33, 53], так и в ответ на инсулин [33, 70]. Эти киназы регулируют активность сотен белков, включая транскрипционные факторы. Логично предположить, что метаболические нарушения должны вызывать значительные изменения генной экспрессии.

Базальное состояние. Изменения базального транскриптома скелетной мышцы человека при СД2Т изучались многократно и выявили значительные отличия по сравнению со здоровым контролем. Один из первых метаанализов, обобщивший 6 исследований, показал, что при СД2Т изменяется экспрессия нескольких сотен генов [74]. Наиболее яркие изменения были связаны со снижением экспрессии генов цикла трикарбоновых кислот и окислительного фосфорилирования, β-окисления жирных кислот и регуляторов метаболизма аминокислот. Снижение экспрессии генов окислительного метаболизма согласуется с последующими большими транскриптомными исследованиями [75, 76] и подтверждается данными протеомного анализа скелетной мышцы людей с СД2Т [53]. Однако другой метаанализ не обнаружил снижения экспрессии этих генов у людей с ИнсРез [77]. Это может объясняться тем, что снижение окислительных возможностей мышц связано не только (и не столько) с ИнсРез, сколько с другими факторами (возраст, уровень двигательной активности и др.). Нарушение экспрессии генов, регулирующих обмен аминокислот при СД2Т, подтвердилось в ряде работ [75–78], так же, как и активация провоспалительных генов и регуляторов убиквитинирования [75, 76]. Эти данные согласуются с повышенным уровнем аминокислот в плазме крови [79] и латентным воспалением в жировой ткани при ожирении [23, 24, 26]. Помимо этого, было обнаружено, что при СД2Т снижена экспрессия мРНК генов белков канонического инсулинового каскада *IRS2*, *PIK3CB*,

PIK3CA, *PIK3R1*, *SLC2A4 (GLUT4)* [76], рецепторов инсулина (*INSR*) и IGF-1 (*IGF1R*) и адаптерного белка тирозинкиназных рецепторов (*GRB14*) [77]. При этом величина снижения экспрессии *INSR* и *IRS2* хоть и коррелировала с выраженностью метаболических нарушений, но оказалась очень мала [80].

Какие факторы отвечают за изменение генной экспрессии при ИнсРез и СД2Т? Комплексные изменения в содержании различных субстратов, метаболитов, гормонов и регуляторных факторов в крови и в скелетной мышце не позволяют дать однозначный ответ. Использование биоинформатических подходов в нескольких работах позволило наметить транскрипционные регуляторы, ассоциированные с генами, изменявшими экспрессию при метаболических нарушениях [78, 80]. Однако эти работы были нацелены на поиск регуляторов, связанных с генами белков инсулинового каскада, тогда как регуляторы, связанные с более масштабными изменениями транскриптомного профиля, во многом остались невыясненными.

Стимуляция инсулином. Изменения инсулин-независимого транскриптома скелетной мышцы при метаболических нарушениях изучались лишь в единичных работах. Поэтому сначала будут рассмотрены эффекты инсулина в клетках и мышцах здоровых людей.

В первичных миотубах человека динамика транскриптома (0,5, 1, 2, 4, 8 и 24 ч) была исследована в одной из ранних работ после стимуляции клеток сверхвысокой концентрацией инсулина (1 мкМ) [81]. Оказалось, что уже на самых ранних этапах изменялась (в основном увеличивалась) экспрессия генов ТФ раннего ответа (*FOS*, *SRF*, *EGR1/2*, *JUNB*, *IER3*, *ATF3* и *IDI*), провоспалительных цитокинов и регуляторов ангиогенеза. На более поздних этапах усиливалась экспрессия генов факторов роста и метаболических ферментов, а через 24 ч изменения практически отсутствовали. Результаты этой работы следует интерпретировать с осторожностью из-за очень высокого уровня инсулина, который поддерживался в течение всего эксперимента, тогда как физиологические концентрации инсулина не превышают 1 нМ в течение относительно коротких интервалов [22]. Тем не менее можно заключить, что, по аналогии с различными стресс-воздействиями в разных клеточных культурах [82], инсулин вызывает быструю активацию генов ТФ раннего ответа в миотубах.

В скелетной мышце людей с нормальной чувствительностью к инсулину изменения транскриптома были исследованы только в двух временных точках после стимуляции инсули-

ном в процессе клэмп-теста. Если через 30 мин изменения генной экспрессии отсутствовали [83], то через 3–4 ч менялась экспрессия сотен генов [83–85]. Как и в цитируемом выше исследовании на миотубах [81], инсулин вызывал экспрессию генов провоспалительных цитокинов (*IL17D*, *CCL2*, *CCL8*, *CXCL2*), их рецепторов (*IL1R1*, *IL13R*) и фактора роста (*TGFB2*), а также нескольких десятков генов ТФ. В числе последних были факторы раннего ответа (*EGR1/3*, *IER2*), факторы семейства AP-1 (*JUNB*, *FOS*, *FOSB*), регуляторы гликолиза и окислительного фосфорилирования (*NR4A1* и *NR4A3*), жирового метаболизма (*SREBF1*), факторы инициации транскрипции (*TBPL1*, *BTF3*) и др. [83–85]. Снижение экспрессии было выявлено для миогенных факторов (*MEF2B*, *MYF6*), ключевого регулятора жирового обмена (*PPARG*), ядерных факторов гепатоцитов (*HNF1/2*), рецептора тиреоидного гормона (*THRA*) [85]. Масштабное изменение экспрессии генов ТФ дает основание полагать, что должна изменяться экспрессия множества генов-мишеней в процессе восстановления после стимуляции инсулином. Ключевые эффекты инсулина в скелетной мышце человека (активация захвата глюкозы, синтеза гликогена и МТОР-зависимого синтеза белка) опосредованы посттрансляционной регуляцией. По-видимому, инсулин также может влиять на эти процессы на уровне транскрипции, в том числе усиливая экспрессию генов гексокиназы-2 (*HK2*), рибосомальных белков и ряда факторов, регулирующих трансляцию [84, 85].

В скелетной мышце людей с метаболическими нарушениями направленность изменений экспрессии генов была сопоставима со здоровым контролем в ответ на стимуляцию инсулином в ходе клэмп-теста [86, 87]. Биоинформатический анализ связал эти изменения с участием интерлейкинов, PPAR и ретиноидных рецепторов [86]. В единственной работе, сопоставлявшей ответ на инсулин при метаболических нарушениях, было показано, что через 5 ч клэмп-теста у людей с ИнсРез изменилась экспрессия меньшего числа генов, чем у здоровых индивидов [87]. В частности, это было связано с отсутствием у людей с ИнсРез влияния инсулина на экспрессию генов ключевых ферментов катаболизма углеводов — киназы пируватдегидрогеназы 4, гексокиназы-2 (*HK2*) и др. При этом у людей с ИнсРез инсулин более выраженно активировал гены ТФ, регулирующие жировой метаболизм (*CEBPA* и *SREBF1*).

Суммируя, стимуляция инсулином вызывает масштабные изменения транскриптомного профиля в мышечных клетках, включая увеличение экспрессии генов различных ТФ, цитокинов,

регуляторов углеводно-жирового обмена и синтеза белка. Однако динамика этих изменений и сигнальные пути, их индуцирующие, остаются практически не изученными, так же, как и изменения транскриптомного ответа на инсулин при развитии метаболических нарушений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Развитие ИнсРез и СД2Т тесно связано со снижением инсулинозависимого захвата глюкозы скелетными мышцами, однако молекулярные механизмы этого нарушения до сих пор неизвестны. При СД2Т не всегда обнаруживаются изменения активации и уровня фосфорилирования сигнальных белков проксимальной части канонического инсулинового каскада (от рецептора до АКТ, рис. 3). Обсуждаются гипотезы, объясняющие снижение инсулинозависимого захвата глюкозы дефектами в дистальной части каскада или неканонической инсулиновой сигнализации на уровне регуляции трафика и слияния GSV с плазматической мембраной [27]. Бурное развитие методов количественной панорамной фосфопротеомики значительно расширило представления о сигнальных реакциях на инсулин. Стало ясно, что активация множества киназ и ТФ выходит далеко за рамки канонического инсулинового каскада. Невысокая способность детектировать низкокопийные белки, которые зачастую играют ключевую роль во внутриклеточной передаче сигнала, пока остается существенным ограничением панорамного фосфопротеомного анализа [54]. Совершенствование аппаратных средств и способов пробоподготовки должно увеличить глубину фосфопротеомного анализа и расширить список сигнальных мишеней инсулина. Эти белки представляют фундаментальный интерес и могут быть потенциальными мишенями новых терапевтических препаратов.

Изменения транскриптомного профиля в скелетных мышцах людей с ИнсРез и СД2Т охарактеризованы достаточно подробно для базального состояния. По-видимому, они вызваны изменением многих факторов, включая и циркулирующие в крови, и находящиеся в мышечной ткани, а также тесно связаны с хроническим недостатком двигательной активности. Однако сигнальные механизмы и ТФ, ответственные за эти изменения в мышечных клетках, почти не изучены. Реакции геной экспрессии на острую стимуляцию инсулином нарушены при СД2Т. Эти изменения до сих пор плохо охарактеризованы, так же, как и регулирующие их механизмы.

Прирост эндогенного инсулина, вызванный приемом пищи, значительно больше при ИнсРез, чем в здоровом состоянии и у людей [22], и у животных [33]. При этом уровень глюкозы и свободных жирных кислот в крови здоровых людей и людей с ИнсРез одинаков [22], а у контрольных животных и животных на жировой диете детектируемые различия в проксимальной части канонического инсулинового каскада минимальны, если вообще есть [33]. Это говорит о том, что способность сигнальной системы отвечать на инсулин сохраняется на молекулярном уровне за счет компенсаторного повышения уровня инсулина. Усиление секреции инсулина может быть связано с большим количеством пищи, потребляемой людьми с избыточной массой тела. Это значит, что для понимания молекулярных различий в сигнализации от инсулина важно исследовать ответы на нормированный объем пищи, моделируя ситуацию в жизни. Такие исследования до сих пор отсутствуют.

Метаболические нарушения вызывают в скелетной мышце комплексные изменения в активации сигнальных белков и ТФ, экспрессии мРНК, содержании их белковых продуктов и различных метаболитов. Они происходят как в базальном состоянии, так и в ответ на стимуляцию инсулином. При этом нет ясной картины о взаимосвязи изменений, происходящих на разных уровнях регуляции в клетке. Для одновременной детекции инсулинозависимых изменений на разных уровнях недавно был предложен так называемый «транс-омиксный» подход, который использует комбинацию широкозахватных фосфопротеомных, протеомных, транскриптомных и метаболомных методик с биоинформатическим анализом. Преимущество транс-омиксного анализа состоит в возможности реконструкции не отдельных каскадов, а молекулярных сетей, состоящих из взаимосвязанных друг с другом каскадов. Такой подход уже позволил выявить в клетках гепатомы крысы молекулярные сети, активирующиеся пико- и наномолярными концентрациями инсулина, характерными для базального состояния и ответа на прием пищи соответственно [88]. Оказалось, что в низких концентрациях инсулин преимущественно влияет на фосфорилирование факторов трансляции, Akt и p38 MAPK, изменяя активность ТФ (Foxo1, Creb1 и др.), разнонаправленно регулирующих экспрессию мРНК ферментов гликолиза, регуляторов синтеза жиров и метаболизма аминокислот, изменяя концентрации соответствующих метаболитов. Напротив, в высоких концентрациях инсулин преимущественно

стимулирует Akt и Erk1/2 MAPK, активируя ТФ раннего ответа (Egr1, Hes1 и др.) и увеличивая экспрессию их генов-мишеней, в том числе ряд других ТФ. Подобный подход был недавно экспериментально использован для реконструкции молекулярных сетей (сигнальные белки → ТФ → гены-мишени → регуляторы метаболизма → метаболиты), отвечающих за стимулируемый инсулином рост эмбриональных клеток *Drosophila melanogaster* S2R+ [89]. В другой работе была одновременно исследована динамика фосфопротеома, транскриптома и протеома [90]. Были реконструированы молекулярные сети, регулирующие содержание различных метаболитов в печени мыши в течение 6 ч после инъекции инсулина. Это позволило понять, что быстрые реакции (изменения углеводного и жирового метаболизма) регулируются на уровне фосфорилирования сигнальных белков, но более поздние (метаболизм аминокислот и нуклеотидов) контролируются дополнительно на уровне экспрессии белков-регуляторов. При этом изменение содержания этих регуляторов происходит главным образом за счет изменения трансляции, а не уровня их мРНК.

Регуляция углеводно-жирового обмена у животных и людей отличается, поэтому использование транс-омиксного анализа для исследования механизмов ИнсРез у человека представляется крайне перспективным направлением. Учитывая ведущую роль скелетной мускулатуры в развитии метаболических нарушений, ближайшие усилия должны быть направлены на комбинирование широкозахватных методов для выяснения молекулярных механизмов развития ИнсРез и СД2Т в скелетной мышце человека.

Вклад авторов. Д.В. Попов, А.В. Воротников – концепция обзора; Д.В. Попов, П.А. Махновский, А.В. Воротников – сбор информации, обсуждение результатов исследований, написание и редактирование текста.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-75-10146).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Di Pino, A., and DeFronzo, R. A. (2019) Insulin resistance and atherosclerosis: implications for insulin-sensitizing agents, *Endocr. Rev.*, **40**, 1447-1467, doi: 10.1210/er.2018-00141.
2. Nencioni, A., Caffa, I., Cortellino, S., and Longo, V. D. (2018) Fasting and cancer: molecular mechanisms and clinical application, *Nat. Rev. Cancer*, **18**, 707-719, doi: 10.1038/s41568-018-0061-0.
3. DeFronzo, R. A., Gunnarsson, R., Bjorkman, O., Olsson, M., and Wahren, J. (1985) Effects of insulin on peripheral and splanchnic glucose metabolism in noninsulin-dependent (type II) diabetes mellitus, *J. Clin. Invest.*, **76**, 149-155, doi: 10.1172/JCI11938.
4. Deer, J., Koska, J., Ozias, M., and Reaven, P. (2015) Dietary models of insulin resistance, *Metabolism*, **64**, 163-171, doi: 10.1016/j.metabol.2014.08.013.
5. Nandi, A., Kitamura, Y., Kahn, C. R., and Accili, D. (2004) Mouse models of insulin resistance, *Physiol. Rev.*, **84**, 623-647, doi: 10.1152/physrev.00032.2003.
6. Kowalski, G. M., and Bruce, C. R. (2014) The regulation of glucose metabolism: implications and considerations for the assessment of glucose homeostasis in rodents, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **307**, E859-871, doi: 10.1152/ajpendo.00165.2014.
7. Humphrey, S. J., Yang, G., Yang, P., Fazakerley, D. J., Stockli, J., et al. (2013) Dynamic adipocyte phosphoproteome reveals that Akt directly regulates mTORC2, *Cell Metab.*, **17**, 1009-1020, doi: 10.1016/j.cmet.2013.04.010.
8. Ohno, S., Quek, L. E., Krycer, J. R., Yugi, K., Hirayama, A., et al. (2020) Kinetic trans-omic analysis reveals key regulatory mechanisms for insulin-regulated glucose metabolism in adipocytes, *iScience*, **23**, 101479, doi: 10.1016/j.isci.2020.101479.
9. Krako Jakovljevic, N., Pavlovic, K., Zujovic, T., Kravic-Stevovic, T., Jotic, A., et al. (2021) In vitro models of insulin resistance: Mitochondrial coupling is differently affected in liver and muscle cells, *Mitochondrion*, **61**, 165-173, doi: 10.1016/j.mito.2021.10.001.
10. Li, Z., Lai, Z. W., Christiano, R., Gazos-Lopes, F., Walther, T. C., et al. (2018) Global analyses of selective insulin resistance in hepatocytes caused by palmitate lipotoxicity, *Mol. Cell. Proteomics*, **17**, 836-849, doi: 10.1074/mcp.RA117.000560.
11. Samsonov, M. V., Podkuychenko, N. V., Khapchaev, A. Y., Efremov, E. E., Yanushevskaya, E. V., et al. (2021) AICAR protects vascular endothelial cells from oxidative injury induced by the long-term palmitate excess, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, doi: 10.3390/ijms23010211.
12. Batista, T. M., Jayavelu, A. K., Wewer Albrechtsen, N. J., Iovino, S., Lebastchi, J., et al. (2020) A cell-autonomous signature of dysregulated protein phosphorylation underlies muscle insulin resistance in type 2 diabetes, *Cell Metab.*, **32**, 844-859.e845, doi: 10.1016/j.cmet.2020.08.007.

13. Haider, N., Lebastchi, J., Jayavelu, A. K., Batista, T. M., Pan, H., et al. (2021) Signaling defects associated with insulin resistance in nondiabetic and diabetic individuals and modification by sex, *J. Clin. Invest.*, **131**, doi: 10.1172/JCI151818.
14. Gaster, M. (2019) The diabetic phenotype is preserved in myotubes established from type 2 diabetic subjects: a critical appraisal, *APMIS*, **127**, 3-26, doi: 10.1111/apm.12908.
15. Varemo, L., Henriksen, T. I., Scheele, C., Broholm, C., Pedersen, M., et al. (2017) Type 2 diabetes and obesity induce similar transcriptional reprogramming in human myocytes, *Genome Med.*, **9**, 47, doi: 10.1186/s13073-017-0432-2.
16. Petersen, M. C., and Shulman, G. I. (2018) Mechanisms of insulin action and insulin resistance, *Physiol. Rev.*, **98**, 2133-2223, doi: 10.1152/physrev.00063.2017.
17. White, M. F., and Kahn, C. R. (2021) Insulin action at a molecular level – 100 years of progress, *Mol. Metab.*, **52**, 101304, doi: 10.1016/j.molmet.2021.101304.
18. American Diabetes Association Professional Practice, C., American Diabetes Association Professional Practice, C., Draznin, B., Aroda, V. R., Bakris, G., Benson, G., Brown, F. M., et al. (2022) 2. Classification and diagnosis of diabetes: standards of medical care in diabetes-2022, *Diabetes Care*, **45**, S17-S38, doi: 10.2337/dc22-S002.
19. Liu, Y., Li, J., Wu, Y., Zhang, H., Lv, Q., et al. (2022) Evidence from a systematic review and meta-analysis: Classical impaired glucose tolerance should be divided into subgroups of isolated impaired glucose tolerance and impaired glucose tolerance combined with impaired fasting glucose, according to the risk of progression to diabetes, *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, **13**, 835460, doi: 10.3389/fendo.2022.835460.
20. Wang, Q., Jokelainen, J., Auvinen, J., Puukka, K., Keinanen-Kiukaanniemi, S., et al. (2019) Insulin resistance and systemic metabolic changes in oral glucose tolerance test in 5340 individuals: an interventional study, *BMC Med.*, **17**, 217, doi: 10.1186/s12916-019-1440-4.
21. Frayn, K. N. (2019) Turning over our fat stores: the key to metabolic health Blaxter Award Lecture 2018, *Proc. Nutr. Soc.*, **78**, 398-406, doi: 10.1017/S0029665118002598.
22. McQuaid, S. E., Hodson, L., Neville, M. J., Dennis, A. L., Cheeseman, J., et al. (2011) Downregulation of adipose tissue fatty acid trafficking in obesity: a driver for ectopic fat deposition? *Diabetes*, **60**, 47-55, doi: 10.2337/db10-0867.
23. Vorotnikov, A. V., Stafeev, I. S., Menshikov, M. Y., Shestakova, M. V., and Parfyonova, Y. V. (2019) Latent inflammation and defect in adipocyte renewal as a mechanism of obesity-associated insulin resistance, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 1329-1345, doi: 10.1134/S0006297919110099.
24. Stafeev, I. S., Vorotnikov, A. V., Ratner, E. I., Menshikov, M. Y., and Parfyonova, Y. V. (2017) Latent inflammation and insulin resistance in adipose tissue, *Int. J. Endocrinol.*, **2017**, 5076732, doi: 10.1155/2017/5076732.
25. Samuel, V. T., and Shulman, G. I. (2016) The pathogenesis of insulin resistance: integrating signaling pathways and substrate flux, *J. Clin. Invest.*, **126**, 12-22, doi: 10.1172/JCI77812.
26. Sakers, A., De Siqueira, M. K., Seale, P., and Villanueva, C. J. (2022) Adipose-tissue plasticity in health and disease, *Cell*, **185**, 419-446, doi: 10.1016/j.cell.2021.12.016.
27. James, D. E., Stockli, J., and Birnbaum, M. J. (2021) The aetiology and molecular landscape of insulin resistance, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **22**, 751-771, doi: 10.1038/s41580-021-00390-6.
28. Sylow, L., Kleinert, M., Richter, E. A., and Jensen, T. E. (2017) Exercise-stimulated glucose uptake – regulation and implications for glycaemic control, *Nat. Rev. Endocrinol.*, **13**, 133-148, doi: 10.1038/nrendo.2016.162.
29. DeFronzo, R. A., Tobin, J. D., and Andres, R. (1979) Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance, *Am. J. Physiol.*, **237**, E214-223, doi: 10.1152/ajpendo.1979.237.3.E214.
30. Kolterman, O. G., Insel, J., Saekow, M., and Olefsky, J. M. (1980) Mechanisms of insulin resistance in human obesity: evidence for receptor and postreceptor defects, *J. Clin. Invest.*, **65**, 1272-1284, doi: 10.1172/JCI109790.
31. Humphrey, S. J., Azimifar, S. B., and Mann, M. (2015) High-throughput phosphoproteomics reveals in vivo insulin signaling dynamics, *Nat. Biotechnol.*, **33**, 990-995, doi: 10.1038/nbt.3327.
32. Minard, A. Y., Tan, S. X., Yang, P., Fazakerley, D. J., Domanova, W., et al. (2016) mTORC1 is a major regulatory node in the FGF21 signaling network in adipocytes, *Cell Rep.*, **17**, 29-36, doi: 10.1016/j.celrep.2016.08.086.
33. Small, L., Brandon, A. E., Parker, B. L., Deshpande, V., Samsudeen, A. F., et al. (2019) Reduced insulin action in muscle of high fat diet rats over the diurnal cycle is not associated with defective insulin signaling, *Mol. Metab.*, **25**, 107-118, doi: 10.1016/j.molmet.2019.04.006.
34. Samuel, V. T., Petersen, K. F., and Shulman, G. I. (2010) Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism, *Lancet*, **375**, 2267-2277, doi: 10.1016/S0140-6736(10)60408-4.
35. Klip, A., McGraw, T. E., and James, D. E. (2019) Thirty sweet years of GLUT4, *J. Biol. Chem.*, **294**, 11369-11381, doi: 10.1074/jbc.REV119.008351.
36. Deshmukh, A. S. (2016) Insulin-stimulated glucose uptake in healthy and insulin-resistant skeletal muscle, *Horm. Mol. Biol. Clin. Invest.*, **26**, 13-24, doi: 10.1515/hmbci-2015-0041.
37. Bogan, J. S. (2012) Regulation of glucose transporter translocation in health and diabetes, *Annu. Rev. Biochem.*, **81**, 507-532, doi: 10.1146/annurev-biochem-060109-094246.
38. Jaldin-Fincati, J. R., Pavarotti, M., Frenedo-Cumbo, S., Bilan, P. J., and Klip, A. (2017) Update on GLUT4 vesicle traffic: A cornerstone of insulin action, *Trends Endocrinol. Metab.*, **28**, 597-611, doi: 10.1016/j.tem.2017.05.002.
39. Leney, S. E., and Tavaré, J. M. (2009) The molecular basis of insulin-stimulated glucose uptake: signalling,

- trafficking and potential drug targets, *J. Endocrinol.*, **203**, 1-18, doi: 10.1677/JOE-09-0037.
40. Stockli, J., Fazakerley, D. J., and James, D. E. (2011) GLUT4 exocytosis, *J. Cell Sci.*, **124**, 4147-4159, doi: 10.1242/jcs.097063.
 41. Ng, Y., Ramm, G., Burchfield, J. G., Coster, A. C., Stockli, J., et al. (2010) Cluster analysis of insulin action in adipocytes reveals a key role for Akt at the plasma membrane, *J. Biol. Chem.*, **285**, 2245-2257, doi: 10.1074/jbc.M109.060236.
 42. Tan, S. X., Ng, Y., Meoli, C. C., Kumar, A., Khoo, P. S., et al. (2012) Amplification and demultiplexing in insulin-regulated Akt protein kinase pathway in adipocytes, *J. Biol. Chem.*, **287**, 6128-6138, doi: 10.1074/jbc.M111.318238.
 43. Dummler, B., and Hemmings, B. A. (2007) Physiological roles of PKB/Akt isoforms in development and disease, *Biochem. Soc. Trans.*, **35**, 231-235, doi: 10.1042/BST0350231.
 44. Hayashi, T., Hirshman, M. F., Kurth, E. J., Winder, W. W., and Goodyear, L. J. (1998) Evidence for 5' AMP-activated protein kinase mediation of the effect of muscle contraction on glucose transport, *Diabetes*, **47**, 1369-1373, doi: 10.2337/diab.47.8.1369.
 45. Lizcano, J. M., Goransson, O., Toth, R., Deak, M., Morrice, N. A., et al. (2004) LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1, *EMBO J.*, **23**, 833-843, doi: 10.1038/sj.emboj.7600110.
 46. Inazuka, F., Sugiyama, N., Tomita, M., Abe, T., Shioi, G., et al. (2012) Muscle-specific knock-out of NUA family SNF1-like kinase 1 (NUAK1) prevents high fat diet-induced glucose intolerance, *J. Biol. Chem.*, **287**, 16379-16389, doi: 10.1074/jbc.M111.302687.
 47. Koh, H. J., Toyoda, T., Fujii, N., Jung, M. M., Rathod, A., et al. (2010) Sucrose nonfermenting AMPK-related kinase (SNARK) mediates contraction-stimulated glucose transport in mouse skeletal muscle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 15541-15546, doi: 10.1073/pnas.1008131107.
 48. O'Neill, B. T., Lauritzen, H. P., Hirshman, M. F., Smyth, G., Goodyear, L. J., et al. (2015) Differential role of insulin/IGF-1 receptor signaling in muscle growth and glucose homeostasis, *Cell Rep.*, **11**, 1220-1235, doi: 10.1016/j.celrep.2015.04.037.
 49. Jaiswal, N., Gavin, M. G., Quinn, W. J., III, Lungo, T. S., Gelfer, R. G., et al. (2019) The role of skeletal muscle Akt in the regulation of muscle mass and glucose homeostasis, *Mol. Metab.*, **28**, 1-13, doi: 10.1016/j.molmet.2019.08.001.
 50. Gauthier, M. S., O'Brien, E. L., Bigornia, S., Mott, M., Cacicedo, J. M., et al. (2011) Decreased AMP-activated protein kinase activity is associated with increased inflammation in visceral adipose tissue and with whole-body insulin resistance in morbidly obese humans, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **404**, 382-387, doi: 10.1016/j.bbrc.2010.11.127.
 51. Xu, X. J., Gauthier, M. S., Hess, D. T., Apovian, C. M., Cacicedo, J. M., et al. (2012) Insulin sensitive and resistant obesity in humans: AMPK activity, oxidative stress, and depot-specific changes in gene expression in adipose tissue, *J. Lipid Res.*, **53**, 792-801, doi: 10.1194/jlr.P022905.
 52. Wang, D., Eraslan, B., Wieland, T., Hallstrom, B., Hopf, T., et al. (2019) A deep proteome and transcriptome abundance atlas of 29 healthy human tissues, *Mol. Syst. Biol.*, **15**, e8503, doi: 10.15252/msb.20188503.
 53. Ohman, T., Teppo, J., Datta, N., Makinen, S., Varjosalo, M., et al. (2021) Skeletal muscle proteomes reveal downregulation of mitochondrial proteins in transition from prediabetes into type 2 diabetes, *iScience*, **24**, 102712, doi: 10.1016/j.isci.2021.102712.
 54. Needham, E. J., Parker, B. L., Burykin, T., James, D. E., and Humphrey, S. J. (2019) Illuminating the dark phosphoproteome, *Sci. Signal.*, **12**, doi: 10.1126/scisignal.aau8645.
 55. Krook, A., Roth, R. A., Jiang, X. J., Zierath, J. R., and Wallberg-Henriksson, H. (1998) Insulin-stimulated Akt kinase activity is reduced in skeletal muscle from NIDDM subjects, *Diabetes*, **47**, 1281-1286, doi: 10.2337/diab.47.8.1281.
 56. Tonks, K. T., Ng, Y., Miller, S., Coster, A. C., Samocha-Bonet, D., et al. (2013) Impaired Akt phosphorylation in insulin-resistant human muscle is accompanied by selective and heterogeneous downstream defects, *Diabetologia*, **56**, 875-885, doi: 10.1007/s00125-012-2811-y.
 57. Albers, P. H., Pedersen, A. J., Birk, J. B., Kristensen, D. E., Vind, B. F., et al. (2015) Human muscle fiber type-specific insulin signaling: impact of obesity and type 2 diabetes, *Diabetes*, **64**, 485-497, doi: 10.2337/db14-0590.
 58. Vind, B. F., Birk, J. B., Vienberg, S. G., Andersen, B., Beck-Nielsen, H., et al. (2012) Hyperglycaemia normalises insulin action on glucose metabolism but not the impaired activation of AKT and glycogen synthase in the skeletal muscle of patients with type 2 diabetes, *Diabetologia*, **55**, 1435-1445, doi: 10.1007/s00125-012-2482-8.
 59. Kim, Y. B., Kotani, K., Ciaraldi, T. P., Henry, R. R., and Kahn, B. B. (2003) Insulin-stimulated protein kinase C lambda/zeta activity is reduced in skeletal muscle of humans with obesity and type 2 diabetes: reversal with weight reduction, *Diabetes*, **52**, 1935-1942, doi: 10.2337/diabetes.52.8.1935.
 60. Kim, Y. B., Nikoulina, S. E., Ciaraldi, T. P., Henry, R. R., and Kahn, B. B. (1999) Normal insulin-dependent activation of Akt/protein kinase B, with diminished activation of phosphoinositide 3-kinase, in muscle in type 2 diabetes, *J. Clin. Invest.*, **104**, 733-741, doi: 10.1172/JCI6928.
 61. Bandyopadhyay, G. K., Yu, J. G., Ofrecio, J., and Olefsky, J. M. (2005) Increased p85/55/50 expression and decreased phosphatidylinositol 3-kinase activity in insulin-resistant human skeletal muscle, *Diabetes*, **54**, 2351-2359, doi: 10.2337/diabetes.54.8.2351.
 62. Karlsson, H. K., Zierath, J. R., Kane, S., Krook, A., Lienhard, G. E., et al. (2005) Insulin-stimulated phosphorylation of the Akt substrate AS160 is impaired in skeletal muscle of type 2 diabetic subjects, *Diabetes*, **54**, 1692-1697, doi: 10.2337/diabetes.54.6.1692.

63. Hojlund, K., Staehr, P., Hansen, B. F., Green, K. A., Hardie, D. G., et al. (2003) Increased phosphorylation of skeletal muscle glycogen synthase at NH2-terminal sites during physiological hyperinsulinemia in type 2 diabetes, *Diabetes*, **52**, 1393-1402, doi: 10.2337/diabetes.52.6.1393.
64. Beeson, M., Sajan, M. P., Dizon, M., Grebenev, D., Gomez-Daspert, J., et al. (2003) Activation of protein kinase C-zeta by insulin and phosphatidylinositol-3,4,5-(PO4)3 is defective in muscle in type 2 diabetes and impaired glucose tolerance: amelioration by rosiglitazone and exercise, *Diabetes*, **52**, 1926-1934, doi: 10.2337/diabetes.52.8.1926.
65. Karlsson, H. K. R., Kasahara, A., Ikeda, M., Chibalin, A. V., Harada, J., et al. (2021) Quantitative phosphoproteomic analysis of IRS1 in skeletal muscle from men with normal glucose tolerance or type 2 diabetes: A case-control study, *Metabolism*, **118**, 154726, doi: 10.1016/j.metabol.2021.154726.
66. Langlais, P., Yi, Z., Finlayson, J., Luo, M., Mapes, R., De Filippis, E., et al. (2011) Global IRS-1 phosphorylation analysis in insulin resistance, *Diabetologia*, **54**, 2878-2889, doi: 10.1007/s00125-011-2271-9.
67. Sun, Y. N., Huang, J. Q., Chen, Z. Z., Du, M., Ren, F. Z., et al. (2020) Amyotrophy induced by a high-fat diet is closely related to inflammation and protein degradation determined by quantitative phosphoproteomic analysis in skeletal muscle of C57BL/6 J mice, *J. Nutr.*, **150**, 294-302, doi: 10.1093/jn/nxz236.
68. Roach, P. J., Depaoli-Roach, A. A., Hurley, T. D., and Tagliabracci, V. S. (2012) Glycogen and its metabolism: some new developments and old themes, *Biochem. J.*, **441**, 763-787, doi: 10.1042/BJ20111416.
69. Meyer, M. M., Levin, K., Grimmsmann, T., Beck-Nielsen, H., and Klein, H. H. (2002) Insulin signalling in skeletal muscle of subjects with or without Type II-diabetes and first degree relatives of patients with the disease, *Diabetologia*, **45**, 813-822, doi: 10.1007/s00125-002-0830-9.
70. Needham, E. J., Hingst, J. R., Parker, B. L., Morrison, K. R., Yang, G., et al. (2022) Personalized phosphoproteomics identifies functional signaling, *Nat. Biotechnol.*, **40**, 576-584, doi: 10.1038/s41587-021-01099-9.
71. Haywood, N. J., Slater, T. A., Matthews, C. J., and Wheatcroft, S. B. (2019) The insulin like growth factor and binding protein family: Novel therapeutic targets in obesity & diabetes, *Mol. Metab.*, **19**, 86-96, doi: 10.1016/j.molmet.2018.10.008.
72. Belfiore, A., Frasca, F., Pandini, G., Sciacca, L., and Vigneri, R. (2009) Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease, *Endocr. Rev.*, **30**, 586-623, doi: 10.1210/er.2008-0047.
73. Hakuno, F., and Takahashi, S. I. (2018) IGF1 receptor signaling pathways, *J. Mol. Endocrinol.*, **61**, T69-T86, doi: 10.1530/JME-17-0311.
74. Varemo, L., Scheele, C., Broholm, C., Mardinoglu, A., Kampf, C., et al. (2015) Proteome- and transcriptome-driven reconstruction of the human myocyte metabolic network and its use for identification of markers for diabetes, *Cell Rep.*, **11**, 921-933, doi: 10.1016/j.celrep.2015.04.010.
75. Scott, L. J., Erdos, M. R., Huyghe, J. R., Welch, R. P., Beck, A. T., et al. (2016) The genetic regulatory signature of type 2 diabetes in human skeletal muscle, *Nat. Commun.*, **7**, 11764, doi: 10.1038/ncomms11764.
76. Wu, C., Xu, G., Tsai, S. A., Freed, W. J., and Lee, C. T. (2017) Transcriptional profiles of type 2 diabetes in human skeletal muscle reveal insulin resistance, metabolic defects, apoptosis, and molecular signatures of immune activation in response to infections, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **482**, 282-288, doi: 10.1016/j.bbrc.2016.11.055.
77. Timmons, J. A., Atherton, P. J., Larsson, O., Sood, S., Blokhin, I. O., et al. (2018) A coding and non-coding transcriptomic perspective on the genomics of human metabolic disease, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 7772-7792, doi: 10.1093/nar/gky570.
78. Chaudhuri, R., Khoo, P. S., Tonks, K., Junutula, J. R., Kolumam, G., et al. (2015) Cross-species gene expression analysis identifies a novel set of genes implicated in human insulin sensitivity, *NPJ Syst. Biol. Appl.*, **1**, 15010, doi: 10.1038/npjbsa.2015.10.
79. Caballero, B., Finer, N., and Wurtman, R. J. (1988) Plasma amino acids and insulin levels in obesity: response to carbohydrate intake and tryptophan supplements, *Metabolism*, **37**, 672-676, doi: 10.1016/0026-0495(88)90089-3.
80. Cen, H. H., Hussein, B., Botezelli, J. D., Wang, S., Zhang, J. A., et al. (2022) Human and mouse muscle transcriptomic analyses identify insulin receptor mRNA downregulation in hyperinsulinemia-associated insulin resistance, *FASEB J.*, **36**, e22088, doi: 10.1096/fj.202100497RR.
81. Hansen, L., Gaster, M., Oakeley, E. J., Brusgaard, K., Damsgaard Nielsen, E. M., et al. (2004) Expression profiling of insulin action in human myotubes: induction of inflammatory and pro-angiogenic pathways in relationship with glycogen synthesis and type 2 diabetes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **323**, 685-695, doi: 10.1016/j.bbrc.2004.08.146.
82. Arner, E., Daub, C. O., Vitting-Seerup, K., Andersson, R., Lilje, B., et al. (2015) Transcribed enhancers lead waves of coordinated transcription in transitioning mammalian cells, *Science*, **347**, 1010-1014, doi: 10.1126/science.1259418.
83. Coletta, D. K., Balas, B., Chavez, A. O., Baig, M., Abdul-Ghani, M., et al. (2008) Effect of acute physiological hyperinsulinemia on gene expression in human skeletal muscle *in vivo*, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **294**, E910-917, doi: 10.1152/ajpendo.00607.2007.
84. Rome, S., Clement, K., Rabasa-Lhoret, R., Loizon, E., Poitou, C., et al. (2003) Microarray profiling of human skeletal muscle reveals that insulin regulates approximately 800 genes during a hyperinsulinemic clamp, *J. Biol. Chem.*, **278**, 18063-18068, doi: 10.1074/jbc.M300293200.
85. Wu, X., Wang, J., Cui, X., Maianu, L., Rhees, B., et al. (2007) The effect of insulin on expression of genes and biochemical pathways in human skeletal muscle, *Endocrine*, **31**, 5-17, doi: 10.1007/s12020-007-0007-x.

86. Rudkowska, I., Jacques, H., Weisnagel, S. J., Marette, A., and Vohl, M. C. (2013) Transcriptomic profiles of skeletal muscle tissue following an euglycemic-hyperinsulinemic clamp in insulin-resistant obese subjects, *Genes Nutr.*, **8**, 91-98, doi: 10.1007/s12263-012-0298-2.
87. Sears, D. D., Hsiao, G., Hsiao, A., Yu, J. G., Courtney, C. H., Ofrecio, J. M., et al. (2009) Mechanisms of human insulin resistance and thiazolidinedione-mediated insulin sensitization, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 18745-18750, doi: 10.1073/pnas.0903032106.
88. Kawata, K., Hatano, A., Yugi, K., Kubota, H., Sano, T., et al. (2018) Trans-omic analysis reveals selective responses to induced and basal insulin across signaling, transcriptional, and metabolic networks, *iScience*, **7**, 212-229, doi: 10.1016/j.isci.2018.07.022.
89. Terakawa, A., Hu, Y., Kokaji, T., Yugi, K., Morita, K., et al. (2022) Trans-omics analysis of insulin action reveals a cell growth subnetwork which co-regulates anabolic processes, *iScience*, **25**, doi: 10.1016/j.isci.2022.104231.
90. Matsuzaki, F., Uda, S., Yamauchi, Y., Matsumoto, M., Soga, T., et al. (2021) An extensive and dynamic trans-omic network illustrating prominent regulatory mechanisms in response to insulin in the liver, *Cell Rep.*, **36**, 109569, doi: 10.1016/j.celrep.2021.109569.

SIGNALING AND GENE EXPRESSION IN SKELETAL MUSCLE IN TYPE 2 DIABETES: CURRENT RESULTS AND OMICS PERSPECTIVES

Review

A. V. Vorotnikov^{1,2*}, D. V. Popov^{1,3*}, and P. A. Makhnovskii¹

¹ Institute of Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences, 123007 Moscow, Russia; E-mail: a.vorotnikov@icloud.com; danil-popov@yandex.ru

² National Medical Research Center of Cardiology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 121552 Moscow, Russia

³ Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

Skeletal muscles primarily contribute to insulin resistance, decreased glucose utilization from the bloodstream and development of type 2 diabetes. Molecular mechanisms that regulate glucose uptake are diverse, including insulin-dependent as the major, but not the only ones. They involve a large range of proteins that control intracellular traffic and exposure of glucose transporters on the cell surface to create an extensive regulatory network. Here, we highlight the advantage of omics approaches for identification of insulin-regulated proteins and genes in human skeletal muscle with varying degrees of metabolic disorders. We discuss methodological aspects of the assessment of metabolic disorders and molecular responses of human skeletal muscle to insulin. The known molecular mechanisms of glucose uptake regulation and the first results of phosphoproteomic and transcriptomic studies are analyzed, which unveiled a large-scale array of insulin targets in muscle cells. They demonstrate that a clear depiction of the changes that occur during metabolic dysfunction requires systemic and combined analysis of the events at different levels of regulation, including signaling pathways, transcription factors, and gene expression. Such an analysis lends perspectives to identify previously undescribed regulatory mechanisms of glucose uptake by skeletal muscle and key regulators as the potential therapeutic targets.

Keywords: skeletal muscle, insulin resistance, insulin signaling, AMPK, glucose uptake, phosphoproteome, transcriptome, type 2 diabetes