

САХАРНЫЙ ДИАБЕТ 2 ТИПА И МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ СИНДРОМ: МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ, КЛЮЧЕВЫЕ СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИОМИШЕНЕЙ ДЛЯ НОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ



© И.И. Дедов^{1,2}, В.А. Ткачук^{2,3}, Н.Б. Гусев², В.П. Ширинский^{2,3}, А.В. Воротников^{2,3}, Т.Н. Кочегура^{2*}, А.Ю. Майоров^{1,2}, М.В. Шестакова^{1,2}

¹Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии, Москва

²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва

³Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии, Москва

Сахарный диабет 2 типа (СД2) является социально-значимым заболеванием, терапия которого остается все еще недостаточно эффективной, отчасти это обусловлено многофакторностью развития нарушений углеводного обмена, механизмы которых полностью не раскрыты. Инсулиновая резистентность (ИР) является первым звеном патогенеза СД2 и связана со снижением способности инсулина усиливать захват глюкозы из кровотока клетками-мишенями. В развитии ИР участвуют такие факторы, как генетическая предрасположенность, избыточное питание и ожирение, стресс и хроническое воспаление в условиях нарушения передачи инсулинового сигнала внутри клеток. Молекулярные механизмы и маркеры ИР недостаточно охарактеризованы, что препятствует ранней диагностике и созданию превентивной лекарственной терапии. Гиперинсулинемический эугликемический клэмп остается «золотым стандартом» для диагностики ИР в условиях клиники. Гипергликемия является отдаленным следствием ИР, при которой реализуется повреждающее действие ряда молекулярных метаболических нарушений, включая оксидативный и карбонильный стресс клеток-мишеней. Молекулярные шапероны и малые белки теплового шока обладают защитным действием на ранних этапах патогенеза СД2, препятствуя развитию стресса эндоплазматического ретикулума и апоптоза. Дисфункция эндотелия сосудов сопряжена с СД2 и его сердечно-сосудистыми осложнениями, однако неясно, на каком этапе патогенеза наступают эти изменения и каковы их молекулярные индукторы. Наконец, еще менее изученным является вопрос о транскрипционной регуляции адипогенной дифференцировки клеток-предшественников при формировании новых жировых депо, а также механизмы активации «бурого» и «бежевого жира», демонстрирующего гиполлипидемическое и гипогликемическое действие. Целью данной работы было выяснение молекулярных механизмов развития ИР и дисфункции эндотелия, роли транскрипционного фактора Pparg1 и малых белков теплового шока, оценка новых методов диагностики ИР и определение биомаркеров для новых антидиабетических препаратов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: инсулиновая резистентность; сахарный диабет; гипергликемия; метаболический синдром; бурая жировая ткань; «бежевые» адипоциты; инсулин; окислительный стресс; PKB/Akt; Pparg1; PPARγ; малые белки теплового шока; дисфункция эндотелия

TYPE 2 DIABETES AND METABOLIC SYNDROME: IDENTIFICATION OF THE MOLECULAR MECHANISMS, KEY SIGNALING PATHWAYS AND TRANSCRIPTION FACTORS AIMED TO REVEAL NEW THERAPEUTICAL TARGETS

© Ivan I. Dedov^{1,2}, Vsevolod A. Tkachuk^{2,3}, Nikolai B. Gusev², Vladimir P. Shirinsky^{2,3}, Alexander V. Vorotnikov^{2,3}, Tatiana N. Kochegura^{2*}, Alexander Y. Mayorov^{1,2}, Marina V. Shestakova^{1,2}

¹Endocrinology Research Centre, Moscow, Russia

²Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

³Russian Cardiology Research and Production Complex, Moscow, Russia

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is a socially important disease with only symptomatic therapy developed due to lack of knowledge about its pathogenesis and underlying mechanism. Insulin resistance (IR) is the first link of T2DM pathogenesis and results in decrease of ability of insulin to stimulate glucose uptake by target cells. Development of IR involves genetic predisposition, excessive nutrition, stress, obesity or chronic inflammation due to disruption of insulin signaling within cells. Molecular mechanisms and markers of IR are characterized rather poorly, which prevents early diagnosis and creation of preventive therapy. Euglycemic clamp test is still a golden standard for IR diagnosis in clinic. Hyperglycemia is a distant consequence of IR in which damaging effect of oxidative and carbonyl stress is realized and diagnosis of T2DM is stipulated. Molecular chaperones and small heat-shock proteins have a protective effect at the early stages of T2DM pathogenesis, preventing development of reticulum stress and apoptosis. Endothelial dysfunction is related to T2DM and its cardiovascular complications, however, it is unknown on which stage of pathogenesis these changes occur and what are their molecular inductors. Finally, transcriptional activity and adipogenic differentiation play an important role in formation of new fat depots from predecessor cells and activation of brown and "beige" fat demonstrating hypolipidemic and hypoglycemic properties. The aim of this study was investigation of pathophysiological mechanisms of development of IR and endothelial dysfunction.



tion, role of transcription factor Prep1 and small heat shock proteins, evaluation of novel methods of diagnostics of IR and therapeutic potential of brown and "beige" fat, determination of biotargets for new antidiabetic drugs.

KEYWORDS: insulin resistance; diabetes mellitus; hyperglycaemia; metabolic syndrome; brown fat; "beige" adipocytes; insulin; oxidative stress; molecular mechanisms; PKB/Akt; Prep1; PPAR γ , small heat shock proteins; endothelial dysfunction

СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ

Проблема борьбы с сахарным диабетом 2 типа (СД2) чрезвычайно актуальна, но лекарственная терапия этого заболевания остается все еще недостаточно эффективной. Во многом это связано с разнообразием факторов риска и механизмов развития инсулиновой резистентности (ИР) – первичного звена в патогенезе СД2, а также недостаточностью средств ее клинической диагностики. ИР проявляется как устойчивость клеток к действию инсулина и возникает из-за нарушения механизмов проведения в них инсулинового сигнала. Несмотря на большой прогресс, достигнутый в понимании этих механизмов, многие важные детали остаются неясными, препятствуя созданию лекарственных средств направленного действия.

Следующее за ИР развитие событий в патогенезе СД2 включает усиление секреции инсулина как ответную реакцию организма на недостаток его действия. Однако длительная гиперинсулинемия ведет к дисфункции β -клеток поджелудочной железы и снижению синтеза инсулина на фоне персистирующей ИР. Как следствие, инсулинзависимый транспорт глюкозы из кровотока в клетки мышечной и жировой тканей окончательно нарушается, в печени усиливаются синтез глюкозы и, соответственно, ее секреция в кровоток. Развивается стабильная гипергликемия, при которой глюкоза и продукты ее обмена, несущие химически активные альдо- и кетогруппы, воздействуют на белки и клетки плазмы крови, а также на сосудистый эндотелий, физически модифицируя и нарушая их функции.

Состояние, задолго предшествующее развитию СД2, предиабет. В это понятие входят такие нарушения углеводного обмена, как нарушение гликемии натощак и нарушение толерантности к глюкозе. На этом этапе возможно предотвращение патологических изменений и восстановление чувствительности клеток-мишеней к инсулину. В связи с этим ранняя диагностика ИР имеет большое практическое значение. Наличие ИР возможно определить или на молекулярном уровне по специфическим маркерам ИР, или на системном уровне с помощью гиперинсулинемического эугликемического клэмп (ГЭК). Оба подхода инвазивны, длительны, трудо- и ресурсоемки, требуют аппаратных средств и отлаженных протоколов. При этом ГЭК все чаще используется для оценки ИР, тогда как молекулярные маркеры ИР не определены в эксперименте и не верифицированы в клинике.

Молекулярные маркеры ИР следует искать среди компонентов инсулинового каскада, которые демонстрируют снижение активации инсулином в условиях ИР. Объектом анализа должны быть ткани-мишени инсулина (печень, мышечная или жировая ткань), что, соответственно, диктует необходимость работы с биопсийным материалом и на практике существенно осложняет проведение такого анализа. Инсулиновый каскад включает рецептор, субстрат инсулинового рецептора (белок IRS), PI3-киназный каскад и систему активации глюкозного

транспортера Glut-4 [1]. Протеинкиназа Akt служит ключевой мишенью PI3-киназного каскада. Она фосфорилирует белок AS160 (Akt substrate of 160 kDa), который регулирует выход Glut-4 на клеточную мембрану и транспорт глюкозы в клетку. Тирозинное фосфорилирование инсулинового рецептора и его субстрата IRS определяет активность инсулинового каскада, а инсулинзависимое, сайт-специфическое фосфорилирование Akt и AS160 – показатель его активности. Эти параметры можно измерять в лизатах клеток или гомогенатах тканей. Нарушение активности инсулинового каскада связано с сериновым фосфорилированием IRS под действием ряда ферментов в условиях, совокупно обозначаемых как факторы риска развития ИР.

Основными факторами риска ИР считаются дислипидемия и ожирение, воспаление, стресс эндоплазматического ретикулума (ЭПР) и оксидативный стресс [1]. Несколькими особняком следует выделить липодистрофию, которая тесно связана с ИР и СД2, но многие детали и механизмы этой взаимосвязи остаются пока неизвестными. За исключением липодистрофии, все эти условия провоцируют латентное воспаление жировой ткани за счет ее гипертрофии и гипоксии, инфильтрации макрофагами с их последующим переходом в воспалительный фенотип и секрецией спектра воспалительных цитокинов [2]. Эти цитокины запускают в адипоцитах воспалительные сигнальные каскады с участием NF- κ B, IKK, JNK и других киназ [3]. Последние используют IRS как один из субстратов, фосфорилируя его по нескольким сериновым остаткам, переводя в неактивное состояние и прерывая передачу сигнала по инсулиновому каскаду [4–8]. Наряду с цитокинами, провоспалительным действием обладают также свободные жирные кислоты (СЖК), уровень которых сильно повышен при пищевой перегрузке и ожирении. СЖК связываются с толл-подобным рецептором TLR4 на адипоцитах, запускающим тот же воспалительный каскад с участием NF- κ B, IKK и JNK. В итоге в адипоцитах усиливается сериновое фосфорилирование IRS и инсулиновый каскад выключается [9, 10].

ИР тесно связана с пищевой перегрузкой и ожирением, о чем свидетельствует феномен обращения симптомов СД2 и восстановления чувствительности к инсулину после бариатрических операций. Поэтому моделирование условий дислипидемии путем обработки культивируемых адипоцитов СЖК является принципиальным подходом при поиске маркеров ИР в эксперименте. Чувствительность каскада к инсулину определяется в этих условиях стандартно, по усилению сайт-специфического фосфорилирования IRS, Akt или AS160 при воздействии инсулина.

Эндотелий сосудов не является классически инсулинзависимым, но служит первичной мишенью инсулина. Дисфункция эндотелия опосредует связь СД2 с сердечно-сосудистыми осложнениями. В условиях гипергликемии химически активная глюкоза и продукты ее обмена, такие как глиоксаль и метилглиоксаль, оказывают повреждающее воздействие на белки плазмы и клеток крови, а

также гликируют белки сосудистого эндотелия [11]. Вместе с малоновым диальдегидом, накапливающимся в результате перекисного окисления избыточных липидов на более ранних стадиях патогенеза СД2, эти соединения обеспечивают развитие оксидативного и карбонильного стресса, нарушающих функции эндотелия. Дисфункция эндотелия проявляется в снижении его барьерных свойств, синтеза главного вазорелаксанта, оксида азота (NO), и усилении синтеза мощного вазоконстриктора, эндотелина-1 (ЭТ-1). Вместе с тем молекулярные мишени глюкозы и тонкие механизмы дисфункции эндотелия при СД2 остаются не до конца выясненными.

Циркулирующий инсулин поддерживает барьерную функцию эндотелия, активируя синтез NO по механизму, идентичному активации входа глюкозы в жировые и мышечные клетки. Параллельно активируя Erk1/2 MAP-киназный каскад, инсулин контролирует также синтез ЭТ-1, тем самым влияя на тонус сосудов. В условиях ИР, гиперинсулинемии и дисфункции эндотелия действие инсулина нарушается, снижается вазорелаксирующая активность NO, усиливается констрикторное влияние ЭТ-1 и увеличивается проницаемость эндотелиального барьера. Изменяется проникновение самого инсулина сквозь эндотелий и его доступность для мышечных и жировых клеток, что вносит дополнительный вклад в изменение инсулинзависимого захвата глюкозы этими клетками из кровотока. Таким образом, нарушение барьерной функции эндотелия может являться одним из факторов, усугубляющих гипергликемию и потенцирующих развитие сосудистых осложнений СД2. Вместе с тем мало известно о том, для какого этапа патогенеза СД2 характерны эти изменения и что происходит с эндотелием сосудов на ранних этапах дислипидемии и предиабета.

Стресс ЭПР является одним из факторов риска ИР. Стресс ЭПР возникает как реакция клеток на избыточное количество белков, их неправильное сворачивание и накопление в ЭПР [12]. Как правило, эта ситуация возникает при избытке поступающих в клетку пищевых ресурсов. Ретикулярный шаперон Grp78 отвечает за рефолдинг белков на ранних стадиях стресса ЭПР, обеспечивая защиту клеток от апоптоза. При стрессе и других неблагоприятных воздействиях также увеличивается уровень малых белков теплового шока (sHSP) [13], препятствующих развитию стресса ЭПР. Такие sHSP, как HspB1, HspB5 и HspB6, обладают выраженной антиапоптотической активностью [14], а HspB1 влияет на активность протеасом и стресс ЭПР [15]. Повышение экспрессии HspB1 улучшает инсулиновую сигнализацию и препятствует активации апоптотических протеинкиназ у тучных пациентов [16]. В ряде случаев механизмы действия шаперонов ретикула и sHSP совпадают. И те, и другие могут участвовать в регуляции синтеза белка, влияя на активность фактора инициации трансляции eIF2a [14]. sHSP легко подвергаются гликированию. При этом изменяются структура, свойства и антиапоптотическая активность sHSP [17, 18]. Однако полученные результаты достаточно противоречивы, касаются только двух белков – HspB1 и HspB5 и мало апробированы в клеточных моделях.

Транскрипционная активность и адипогенная дифференцировка играют важную роль в патогенезе СД2. Избыточное потребление пищи при малоактивном образе жизни ведет к развитию ИР как адаптивной реакции

вследствие перегрузки существующих жировых депо. Многие сахароснижающие препараты, используемые для терапии СД (тиазолидиндионы, производные сульфонилмочевины, глиниды, инсулин), активируют ключевой регулятор адипогенной дифференцировки PPAR γ , вызывая увеличение массы тела за счет образования новых жировых депо [19]. Однако пилотный анализ инсулиновых каскадов клетки показывает возможность селективного воздействия на рост и деление клеток без одновременной индукции липо- и адипогенеза. Потенциальным кандидатом является транскрипционный фактор Prer1 TALE-семейства гомеобоксных белков. Prer1 не только регулирует активность PPAR γ , но также усиливает экспрессию глюкозного транспортера Glut4 и чувствительность к инсулину [20–22].

Стимуляция дифференцировки преадипоцитов жировой ткани в клетки бурого и «бежевого» жира рассматривается как многообещающая альтернатива фармакологической терапии СД2. Известно, что бурый и «бежевый» жир обладают гиполипидемическим и гипогликемическим свойствами. Их клетки имеют разобшающий механизм, способствующий утилизации жиров и глюкозы без получения энергии и, следовательно, не подавляемый избытком этих пищевых ресурсов. Его ключевой участник – белок UCP-1, или термогенин. Он разобшает дыхательную цепь, снижает потенциал митохондрий и синтез в них АТФ. Как следствие, бурые и «бежевые» адипоциты могут сжигать жиры, переводя их энергию в тепло. Экспрессию термогенина и дифференцировку жировых клеток-предшественников в «бежевые» адипоциты контролирует локальный гормон ирисин [23]. Ирисин образуется из белка-предшественника Fndc5, экспрессия которого находится под контролем транскрипционного фактора PGC1a [24]. По нашим данным, экспрессию PGC1a, в свою очередь, контролирует Prer1. Таким образом, Prer1 может регулировать образование бурого жира и быть потенциальной мишенью для активации термогенеза.

Бурая жировая ткань активно изучается в последнее десятилетие [25–30], а «бежевые» адипоциты открыты лишь в 2012 г. [31, 32]. Визуализировать бурую жировую ткань впервые стало возможным при применении ПЭТ-КТ с 18-фтор-дезоксиглюкозой (18FDG) [33]. В последние годы в качестве альтернативного подхода успешно используется МР-спектроскопия [34]. Разработка этих подходов позволит проследить эффективность направленной жировой дифференцировки в бурый и «бежевый» жир у пациентов с СД2 в рамках персонализированной медицины.

Целью данного комплексного исследования было выяснение механизмов развития и новых способов диагностики ИР, определение дисфункции эндотелия как фактора риска сердечно-сосудистых осложнений при СД2, а также поиск биомаркеров для новых антидиабетических препаратов.

КЛИНИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ИНСУЛИНОВОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ

На современном этапе наибольшее внимание уделяется таким методам количественной оценки действия инсулина, как ГЭК и математические модели на основе внутри-

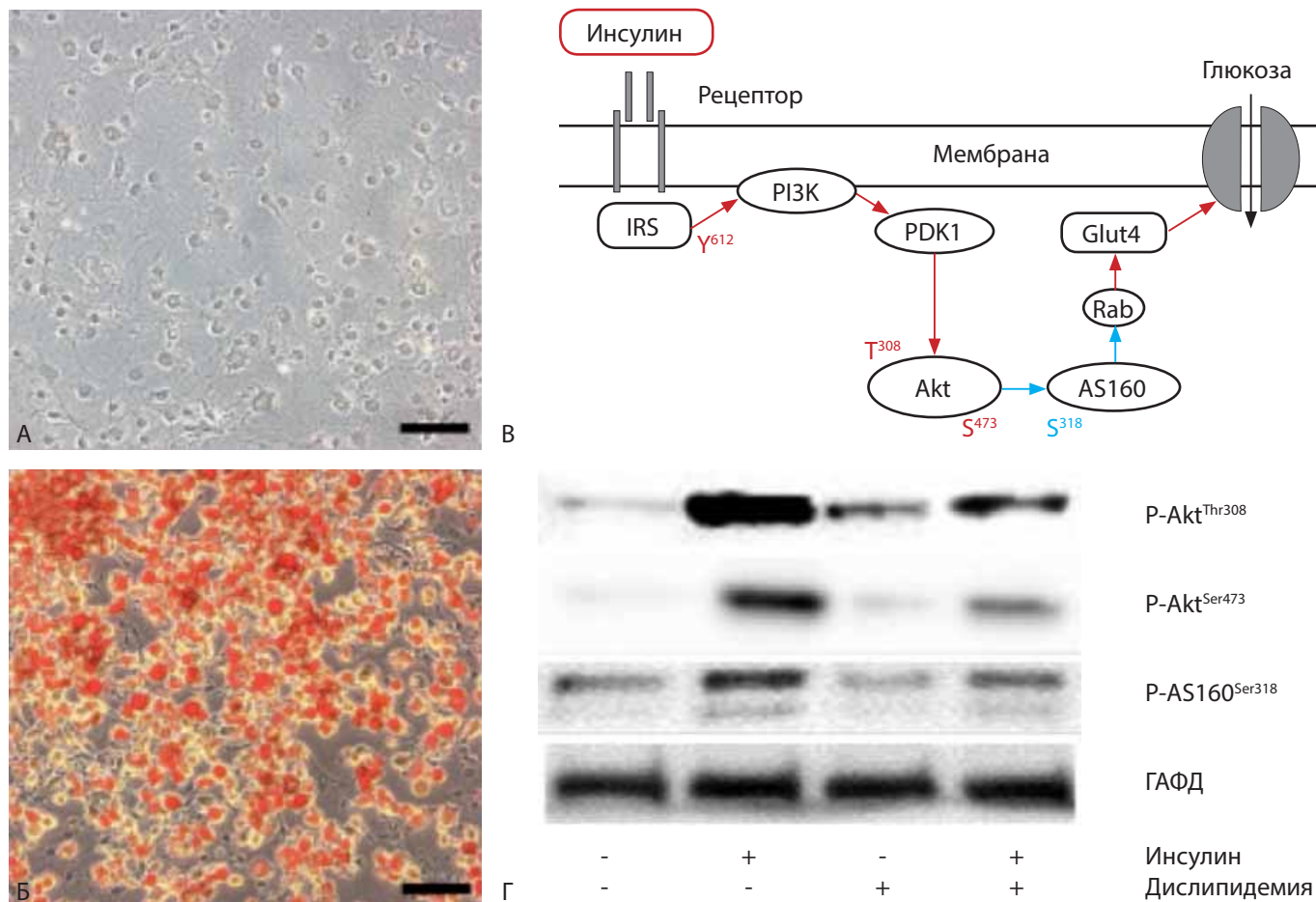


Рис. 1. Определение молекулярных маркеров ИР в линейных адипоцитах 3Т3Л1. (А) Культура преадипоцитов и (Б) зрелых адипоцитов 3Т3Л1 с липидными каплями, окрашенными OilRedO. Масштабный отрезок 100 нм. (В) Схема передачи инсулинового сигнала в жировых и мышечных клетках от рецептора до инсулинзависимого транспортера глюкозы Glut4. Красным и синим цветом показаны активирующие и ингибирующие воздействия и фосфорилируемые остатки соответственно. (Г) Способность инсулина стимулировать фосфорилирование компонентов каскада падает в условиях экспериментальной ИР, вызванной дислипидемией (обработкой клеток пальмитиновой кислотой в течение суток). Показаны репрезентативные результаты вестерн-блоттинга лизатов клеток, которые стимулировали или не стимулировали 100 нМ инсулином в течение 20 мин; для контроля нагрузки использовали окраску на глицеральдегидфосфатдегидрогеназу (ГАФД).

венного (минимальная модель, FSIGTT) и перорального (OSIG) глюкозотолерантного теста или определение глюкозы и инсулина натощак (с вычислением целого ряда индексов, в том числе HOMA, QUICKI, Matsuda и др.). Считается, что использование различных индексов возможно в крупных эпидемиологических исследованиях и мало применимо для индивидуальных измерений [35].

ГЭК признан основным методом диагностики ИР и имеет ряд преимуществ, в частности, возможность оценки чувствительности к инсулину без риска гипогликемии и последующего выброса контринсулярных гормонов, без влияния эндогенного инсулина и колебаний уровня гипергликемии. Помимо этого, ГЭК совместим с инновационными методами исследования метаболизма (непрямая калориметрия, биопсия тканей, позитронно-эмиссионная томография и др.), однако этот метод достаточно трудоемкий и дорогостоящий, что ограничивает его применение в широкой клинической практике [36].

С целью усовершенствования диагностики ИР мы провели детальное сравнение ГЭК и HOMA-ИР. В исследовании участвовали пациенты с впервые выявленным СД2 или предиабетом в сопоставлении с контрольной группой здоровых добровольцев без нарушений углеводного обмена. По данным ГЭК значения М-индекса составили >7,0 мг/кг/мин в группе контроля (пациенты без нарушения углеводного обмена с нормальной чувствитель-

ностью к инсулину). В группе впервые выявленного СД2/предиабета М-индекс варьировал от 0–2 мг/кг/мин (2 случая, выраженная ИР) до 2–4 мг/кг/мин (9 случаев, умеренная ИР) и 4–6 мг/кг/мин (4 случая, слабо выраженная ИР). Таким образом, два этих метода оценки ИР дают сходные, но несовпадающие результаты. Они показывают, что ГЭК более точен при количественной оценке ИР. Дополнительные исследования необходимы, чтобы понять, насколько ГЭК пригоден для определения предиабета как состояния, при котором возможна эффективная ремиссия метаболических нарушений в патогенезе СД2.

В ходе проведенных исследований на обширной группе пациентов было выявлено, что ИР в общем и липодистрофия в частности могут встречаться при многих эндокринных и аутоиммунных заболеваниях. Так, было обнаружено, что частота нарушений углеводного обмена (предиабета и манифестного сахарного диабета) составляла 55% у пациентов с болезнью Иценко-Кушинга и 38% у пациентов с акромегалией. Болезнь Иценко-Кушинга и акромегалия характеризуются высокой степенью ИР, как минимум в 8 раз превышающей значения для общей популяции. Поскольку наиболее существенными факторами риска развития нарушений углеводного обмена у пациентов с СД вторичного генеза являются ИР и гиперглюкогемия, то пациентам с данными заболеваниями необходима оценка ИР с помощью ГЭК. Кроме того,

впервые были описаны IP и липодистрофия как проявления аутоиммунного полигландулярного синдрома 1 типа (АПС1) – моногенного аутоиммунного заболевания, развившегося вследствие гомозиготной мутации в гене *AIRE* с.760>Т р.Р257Х. Данное наблюдение является первым и на сегодняшний день единственным в мире случаем развития генерализованной липодистрофии у пациента с АПС1 [37]. Данное наблюдение свидетельствует о необходимости проведения теста на наличие IP у пациентов с аутоиммунными заболеваниями.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ ИНСУЛИНОВОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ

Нарушение инсулинового каскада при активации IP состоит в снижении инсулинзависимого фосфорилирования участников и мишени этого каскада, необходимого для их активации. Логично, что эти показатели могут служить молекулярными маркерами IP. Для того чтобы проверить эту гипотезу и удостовериться в сходстве таких изменений при IP различного генеза, мы использовали стандартную модель линейных адипоцитов 3T3L1. Эти клетки поддерживаются в культуре как предшественники (рис. 1А) и дифференцируются в адипоциты непосредственно перед экспериментом. Зрелые адипоциты (рис. 1Б) отличаются наличием жировых капель, выявляемых специальными красителями, и представляют собой переживающую культуру. В них полностью представлен инсулиновый каскад (рис. 1В), активацию которого последовательно отражают фосфорилирование белка IRS по тирозину Tyr-612, киназы Akt по двум остаткам треонина Thr-308 и серина Ser-473, и белка AS160 (субстрата Akt с массой 160 кДа) по остатку серина Ser-318. Именно последний регулирует выход на поверхность клетки глюкозного транспортера Glut-4. Сайт-специфический анализ фосфорилирования этих белков до и после кратковременной обработки клеток инсулином показывает степень активации этих белков и каскада в целом.

На рис. 1Г показано, что в зрелых адипоцитах 3T3L1 инсулин значительно активирует фосфорилирование Akt и AS160, однако в условиях экспериментальной дислипидемии (длительная обработка клеток конъюгатом альбумина с пальмитиновой кислотой) активация снижается. Аналогичное снижение этих показателей наблюдали с другими индукторами IP, моделируя условия воспаления (обработка клеток липополисахаридом), стресса ЭПР (обработка брэфелдином-А) или гипоксии (обработка солями кобальта). Таким образом, независимо от причины, IP характеризуется сходным снижением инсулинзависимого фосфорилирования Akt и AS160, которые могут служить маркерами IP.

Для валидации этих белков как маркеров IP у человека был проведен пилотный анализ мышечных биопсий. Он подтвердил, что инсулин стимулирует фосфорилирование Akt по остатку Ser-473 у здоровых доноров. При этом уровень фосфорилирования Ser-473 у больных СД2 был ниже. Мы не обнаружили достоверных различий между пациентами со слабой (М-индекс 4–6), умеренной (2–4) и выраженной (<2) степенью IP. Эти результаты указывают на Ser-473 в Akt как потенциальный маркер IP.

В лейкоцитах здоровых доноров фосфорилирование Ser-473 в Akt также возрастало при действии инсулина

как *in vitro* (при стимуляции выделенных лейкоцитов инсулином), так и *in vivo* (в лейкоцитах, выделенных через 4 ч после начала клэмп-теста по сравнению с таковыми, взятыми до начала клэмп-теста). В то же время изменения этого параметра были незначительны у больных СД2, что согласуется с результатами, полученными с использованием мышечных биопсий. Таким образом, уровень фосфорилирования Ser-473 в Akt может маркировать состояние IP, а лейкоциты периферической крови могут служить удобным объектом, отражая ситуацию в инсулинзависимых тканях.

Мы исследовали гипотезу о том, что, независимо от причины возникновения, развитие IP опосредовано активацией воспалительного каскада и стрессзависимых киназ JNK и IKK как его главных участников. При всех способах экспериментальной индукции IP в адипоцитах 3T3L1 наблюдался более высокий уровень фосфорилирования JNK, чем в адипоцитах без IP. В модели дислипидемии при этом наблюдалось усиление ингибиторного фосфорилирования белка IRS по остатку Ser-302, который считается субстратом JNK (Sun & Liu, 2009). Ингибиторный анализ JNK в резистентных адипоцитах 3T3L1 показал частичное восстановление инсулинзависимого фосфорилирования Akt и AS160. Эти результаты свидетельствуют о том, что JNK опосредует развитие IP различного генеза в адипоцитах 3T3L1, по-видимому, за счет серинового фосфорилирования IRS и нарушения передачи инсулинового сигнала. Таким образом, фосфорилирование и активация JNK также являются потенциальными маркерами IP наряду с Akt и AS-160.

ШАПЕРОНЫ И МАЛЫЕ БЕЛКИ ТЕПЛООВОГО ШОКА

Гипергликемия сопровождается развитием карбонильного стресса и накоплением различных конечных продуктов гликирования белков. Все это приводит к нарушению протеостаза, нормального функционирования ферментов и формированию агрегатов денатурированных белков. Для предотвращения этих неблагоприятных процессов происходит активация сложной системы шаперонов, препятствующих агрегации денатурированных белков и их частичной или полной ренатурации. Малые белки теплового шока (small heat shock proteins, sHsp) являются одним из компонентов системы шаперонов, и нарушение их работы может являться одним из факторов патогенеза СД2.

Мы исследовали влияние карбонильных соединений на структуру и свойства sHsp, а также факторы, влияющие на шапероноподобную активность этих белков. Известно, что при СД синтез ряда sHsp увеличивается в некоторых отделах мозга, сетчатке, сердце и клетках почек [38]. Повышение уровня sHsp защищает клетку от окислительного стресса, способствует эффективной передаче сигнала от инсулинового рецептора внутрь клетки и ингибирует процессы апоптоза. По этой причине различные способы повышения внутриклеточной концентрации малых белков теплового шока могут оказаться перспективными при лечении СД.

Связанные с СД2 нарушения метаболизма углеводов и жиров сопровождаются накоплением высокорекреционных карбонильных соединений, в частности, метилглиоксаля. Существует много сведений о модификации

малых белков теплового шока метилглиоксалем [39]. Эти данные в основном касаются двух малых белков теплового шока, а именно HspB1 и HspB5 (α B-кристаллина). Эти белки эффективно модифицируются метилглиоксалем, и эта модификация может приводить к изменению олигомерной структуры, способности взаимодействовать с белками-партнерами, изменению антиапоптотической и шаперонной активности sHsp [39]. Следует отметить, что опубликованные данные достаточно противоречивы и касаются только двух из десяти экспрессируемых в тканях человека sHsp. Поэтому мы подробно исследовали модификацию малого белка теплового шока HspB6 метилглиоксалем и выяснили, что эта модификация влияет на стабильность HspB6, его способность взаимодействовать с белком-партнером HspB1, а также на способность HspB6 фосфорилироваться под действием cAMP-зависимой протеинкиназы [40].

В условиях избыточной пищевой нагрузки, карбонильного стресса и нарушенного протеостаза при СД2 особое значение имеет шапероноподобная активность sHsp, т.е. их способность предотвращать агрегацию частично денатурированных белков. Механизм шапероноподобной активности и ее зависимость от структуры sHsp и различных условий остаются малопонятными. Поэтому мы исследовали влияние различных условий и точечных мутаций на структуру и шапероноподобную активность HspB1 и HspB6. Установлено, что в условиях, моделирующих условия пищевой нагрузки внутри клетки (высокие концентрации белка, так называемый краудинг эффект), происходит изменение олигомерного состояния HspB6 [41] и HspB1 [42]. Существенные изменения в олигомерной структуре HspB1 происходят при точечных мутациях в N-конце [43] и α -кристаллиновом домене [42]. Эти изменения в олигомерной структуре HspB1 сопровождаются, как правило, уменьшением шапероноподобной активности sHsp. Эти данные указывают на возможный механизм шапероноподобной активности sHsp, играющих важную защитную роль при патологических процессах, происходящих при СД2.

ИНСУЛИНОВАЯ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ, КАРБОНИЛЬНЫЙ СТРЕСС И ДИСФУНКЦИЯ ЭНДОТЕЛИЯ

Эндотелий сосудов является первой мишенью инсулина в организме, секретируемого в кровотоке β -клетками поджелудочной железы. Аналогично эндотелий является первой мишенью активных форм кислорода и карбонильных аддуктов метаболизма глюкозы и жирных кислот, образующихся в результате окислительного и карбонильного стресса при пищевой перегрузке, ожирении и СД2. Вместе с тем на данный момент не вполне понятно, какие изменения происходят в эндотелии в стрессовых условиях, провоцируют ли они развитие и/или поддерживают состояние сахарного диабета.

Воздействие карбонильного стресса ожидается и на ранних, и на поздних этапах патогенеза СД2. Малоновый диальдегид (МДА) характерен для ранних стадий, являясь продуктом перекисного окисления жирных кислот, избыточных при ожирении. Напротив, накопление карбонильных продуктов распада глюкозы, таких как глиоксаль (ГО) и метилглиоксаль (МГО), происходит на поздних этапах развития СД2 в условиях устойчивой

гипергликемии и ведет к гликированию белков плазмы и клеток крови, в частности гемоглобина.

Для того чтобы понять, с какими этапами патогенеза СД2 может быть связана дисфункция эндотелия, мы экспериментально смоделировали условия дислипидемии, гиперинсулинемии и гипергликемии в линейных клетках EA.hy926 гибридного эндотелия сосудов человека. Для создания карбонильного стресса клетки обрабатывали несколько часов МДА, ГО или МГО; при этом МДА моделировал карбонильный стресс при дислипидемии, а ГО и МГО – при гипергликемии.

Низкомолекулярная проницаемость эндотелиального монослоя EA.hy926 повышалась только в условиях дислипидемии, но не гиперинсулинемии или гипергликемии. Это нарушение проявлялось как снижение электрического сопротивления (импеданса) монослоя как в стационарных условиях, так и при воздействии тромбина – классического индуктора проницаемости. Эти данные свидетельствуют о том, что дисфункция эндотелия может происходить при дислипидемии на ранних этапах патогенеза СД2.

Чтобы выяснить влияние карбонильного стресса, был проведен сравнительный анализ эффектов МДА, ГО и МГО на проницаемость монослоя эндотелия EA.hy926 [44]. Только МДА концентрационно-зависимо и необратимо повышал проницаемость эндотелиального монослоя в течение 4–6 ч после добавления к клеткам, тогда как ГО или МГО на эндотелиальный барьер не влияли. Аналогичное повреждающее действие оказывал неприродный глицеральдегид (ГА). Таким образом, вероятно, что только бифункциональные альдегиды с длиной углеродной цепи 3 и более влияют на проницаемость эндотелия *in vitro* за счет своей «сшивающей» активности, однако детальный механизм их действия требует уточнения. Избирательный эффект МДА на эндотелиальный барьер подтверждается экспериментами с FITC-меченным декстраном, которые отражают суммарную проницаемость для низко- и высокомолекулярных соединений.

Прижизненный видеоанализ клеток EA.hy926, обработанных карбонилами, показал, что только МДА угнетает их ламеллоподиальную активность. Поскольку эта активность отвечает за формирование межклеточных контактов и барьерную функцию, ее нарушение может являться клеточным механизмом действия МДА. Для того чтобы прояснить молекулярный механизм действия МДА, был проведен анализ структуры актинового и тубулинового цитоскелетов. Актин формировал нормальную сеть тонких филаментов, а тубулиновые микротрубочки – классические радиальные структуры по всей цитоплазме контрольных, а также обработанных ГО или МГО клеток. Все эти клетки формировали плотные контакты друг с другом. Напротив, в обработанных МДА клетках актиновый цитоскелет был менее выражен и деформирован. Микротрубочки распределялись хаотично, без радиальной поляризации и локализовались преимущественно в центре клеток. Зоны межклеточных контактов были неоднородны и редуцированы. Эта картина хорошо согласуется с повышенной проницаемостью клеточного монослоя после обработки МДА, но не другими карбонилами.

Для того чтобы определить внутриклеточные мишени МДА и МГО, были использованы вестерн-блоттинг

и специальные антитела, реагирующие со связанными с белками радикалами МДА или МГО. В клетках EA.hy926 были обнаружены три основных и несколько минорных белков, модифицируемых МДА и МГО [44]. Они соответствовали мажорным белкам в клеточных экстрактах, но отличались между собой. Если МДА в основном модифицировал белки с массами около 50, 200 и >250 кДа, то МГО – белки с массами около 50, 65 и 150 кДа. Таким образом, профили МДА- и МГО-меченных белков по большей части различны и могут отражать модификацию разных клеточных белков.

Пилотный анализ активности инсулинового каскада в клетках EA.hy926 не выявил существенных изменений в степени фосфорилирования мишеней инсулинового каскада (белки IRS, Akt и eNOS) ни в условиях дислипидемии, ни в условиях карбонильного стресса, связанного с гипергликемией и вызванного ГО или МГО. Вместе с тем, в отличие от ГО и МГО, МДА явно оказывал стрессовое воздействие, которое отражалось на активации стрессзависимых p38 MAP-киназ. Эти данные означают, что внутриклеточный механизм действия МДА скорее связан с прямым воздействием на белки цитоскелета, а не с нарушением работы сигнальных каскадов.

В совокупности представленные результаты свидетельствуют о большой вероятности нарушения барьерной функции эндотелия уже на ранних этапах патогенеза СД2 за счет карбонильного стресса, который опосредован МДА при дислипидемии и ожирении. Молекулярный механизм действия МДА связан, по-видимому, с ковалентной модификацией белков, в том числе цитоскелета, а не с нарушением активности сигнальных каскадов клетки. Клеточный механизм действия МДА связан с изменением структуры цитоскелета, что ведет к нарушению краевой активности цитоплазмы, дестабилизации межклеточных контактов и усилению проницаемости эндотелиального монослоя.

ИНСУЛИНОВАЯ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ, АДИПОГЕННАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА И ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ ФАКТОР PREP1

Чувствительность к инсулину контролируется в клетках на разных уровнях. Если посттрансляционные модификации и белок-белковые взаимодействия реализуют быстрые изменения активности инсулинового каскада, то транскрипционные факторы контролируют долгосрочные изменения экспрессии белков на транскрипционно-трансляционном уровне. В поиске новых терапевтических мишеней мы определили, что транскрипционный фактор Prep1 TALE-семейства гомеобоксных регулирует чувствительность к инсулину.

Искусственное снижение экспрессии Prep1 в модельных преадипоцитах мыши 3T3-L1 значительно ускоряло дифференцировку клеток в зрелые адипоциты, тогда как повышение экспрессии тормозило адипогенез [21, 45]. Полногеномный анализ показал, что снижение экспрессии Prep1 переводит клетки 3T3-L1 в преактивированное состояние, изменяя экспрессию значительной части генов, важных для адипогенной дифференцировки. Prep1 оказывал сходный эффект при разных комбинациях дифференцировочных агентов, что свидетельствует о действии Prep1 на уровне генома, а не на уровне отдельных

белков или сигнальных каскадов. Сходные результаты были получены в первичной культуре клеток из жировой ткани мышей с пониженной экспрессией Prep1.

Клетки со сниженной экспрессией Prep1 имели также повышенную чувствительность инсулинового каскада. Исследуя механизм, мы выяснили, что Prep1 подавляет экспрессию инсулинзависимого транспортера глюкозы Glut4. Таким образом, Prep1 контролирует два ключевых процесса в патогенезе СД2, такие как ИР и адипогенез, являясь потенциальной терапевтической мишенью.

Полногеномный анализ взаимодействия Prep1 с ДНК в клетках 3T3-L1 показал, что Prep1 связывается как с ранее установленными мишенями, общими для различных клеток, так и с генами-мишенями, специфичными для адипоцитов. Среди последних, составляющих большую половины всех генов-мишеней Prep1, были выявлены гены, играющие важную роль в адипогенной дифференцировке, такие как Cebpa, Cebpд и Lama4. Prep1 непосредственно связывался с промоторами этих генов, регулируя их экспрессию. При этом Prep1 влиял на формирование многокомпонентных комплексов, связывающих активные участки хроматина («hotspots»). Это значит, что механизм действия Prep1 связан с другими партнерами, которые могут также являться потенциальными терапевтическими мишенями.

Детализируя механизм действия Prep1, мы обнаружили, что он избирательно влияет на модификации хроматина. Так, Prep1 значительно изменял метилирование лизина-4, но не влиял на ацетилирование лизина-27 в гистоне 3. Это говорит о том, что Prep1 не изменяет распределения активных энхансеров в преадипоцитах, но может влиять на их «отложенную» активность вследствие дополнительных модификаций, которые могут проявляться под действием других стимулов [45].

Известно, что на системном уровне ИР проявляется в снижении инсулинзависимого захвата глюкозы из кровотока и усилении синтеза глюкозы *de novo* в печени. Для того чтобы исследовать функции Prep1 в печени, мы использовали трансгенных мышей с печеньеспецифическим нокаутом гена *Prep1*. Выделенные из них гепатоциты имели повышенную чувствительность к инсулину и, соответственно, сниженную активность глюконеогенеза. Анализируя механизм этого явления, мы выяснили, что Prep1 контролирует экспрессию двух ключевых ферментов глюконеогенеза, фосфоенолпируват карбоксикиназы (Pepck) и глюкозо-6-фосфатазы (G6pc). При этом действие Prep1 было опосредовано Wnt-сигнальным каскадом, поскольку изменялся уровень β-катенина, отвечающего за ядерную локализацию белковых комплексов, содержащих мастер-регулятор глюконеогенеза Foxo1 [46, 47]. Как следствие, внутриклеточная локализация и стабильность Foxo1 изменялись при нокауте Prep1. Поскольку Foxo1 является одной из основных мишеней Akt в контексте инсулинового каскада, эти результаты указывают на функцию Prep1 как ключевого транскрипционного регулятора инсулинового каскада.

ИНСУЛИНОВАЯ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ, ЛИПОДИСТРОФИЯ И МУТАЦИИ ГЕНОВ

Наследственные липодистрофии представляют собой гетерогенную группу редких заболеваний, характе-

ризующихся полной или частичной потерей подкожной жировой клетчатки, а также ее неправильным перераспределением, что отличает эту группу заболеваний от ожирения. Однако, так же как и ожирение, эти заболевания сопровождаются различными метаболическими нарушениями: ИР и сахарным диабетом, жировым гепатозом и стеатогепатитом, дислипидемией, артериальной гипертензией. Проведено молекулярно-генетическое исследование у 58 пациентов (45 взрослых и 13 детей) из 51 семьи с клинической картиной различных форм липодистрофий и ИР с использованием высокопроизводительного параллельного секвенирования (платформа Ion Torrent) панели Custom Ion Ampliseq, включавшей праймеры для мультиплексной амплификации следующих 18 генов, ассоциированных с развитием липодистрофии и инсулинорезистентности: *AGPAT2*, *BSCL2*, *CAV1*, *PTRF*, *PSMB8*, *LMNA*, *PPARG*, *PLIN1*, *AKT2*, *CIDECA*, *LIPE*, *LMNB2*, *PIK3CA*, *PPP1R3A*, *POLD1*, *WRN*, *ZMPSTE24*, *BANF1* [48]. Биоинформатическая обработка данных секвенирования проводилась с использованием пакета программ ANNOVAR (<http://annovar.openbioinformatics.org/>).

Впервые в России проведено исследование наследственных липодистрофий не только с клинических, но и с молекулярно-генетических позиций. Помимо этого, нами впервые для диагностики различных форм липодистрофии применен метод секвенирования нового поколения с помощью специально созданной панели из 18 генов-кандидатов. Впервые в России описаны семьи с выраженной ИР и семейной парциальной липодистрофией 2 типа вследствие мутации R482W в гене *LMNA* [49] и 3 типа вследствие мутации R212Q в гене *PPARG* [50]. Следует заметить, что мутация R482W гена *LMNA* оказалась наиболее частой причиной парциальной липодистрофии в исследуемой популяции (у 7 пациентов из 3 семей из 40 пациентов с парциальной липодистрофией, 17,5%). Впервые в мире липодистрофия описана как возможное клиническое проявление аутоиммунного полигландулярного синдрома 1-го типа [51]. Данное наблюдение также демонстрирует, что ИР в общем и липодистрофия в частности могут встречаться при многих эндокринных и аутоиммунных заболеваниях. Впервые в России описано разнообразие эндокринной патологии при синдроме Вернера вследствие мутаций в гене *WRN* (на примере 3 пациентов). В результате изучения молекулярно-генетических основ ИР и липодистрофии совместно с зарубежными соавторами описана новая форма генерализованной липодистрофии, ассоциированной с прогероидным синдромом вследствие мутации T10I в гене *LMNA*, отличающаяся от других прогероидных синдромов выраженными проявлениями ИР и связанными с ней метаболическими нарушениями [52].

Впервые в России изучены и проанализированы клинико-лабораторные данные пациентов с различными формами наследственных липодистрофий (парциальными липодистрофиями, генерализованными липодистрофиями и прогероидными синдромами).

Результаты проведенного исследования также легли в основу международного консенсуса по диагностике и лечению различных форм липодистрофий, опубликованного в 2016 г. [53]. Наше исследование показало, что при проведении диагностики и дифференциальной диагностики различных форм наследственных липо-

дистрофий важное значение имеет генетическое исследование, предпочтительно методом секвенирования нового поколения. И хотя жесткие критерии клинической диагностики липодистрофии еще не найдены, совместно, в том числе на основании полученных нами данных, были предложены клинические параметры, увеличивающие подозрение на наличие липодистрофии: выраженность скелетной мускулатуры, флебомегалия, выраженный *acanthosis nigricans*, прогероидные черты, неалкогольная жировая болезнь печени, синдром поликистозных яичников, гипертриглицеридемия, сахарный диабет с потребностью в инсулине более 2 ЕД/кг/сут. На основании полученных данных также был предложен алгоритм диагностики различных форм липодистрофий [48].

ИНСУЛИНОВАЯ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ И ГОРМОНЫ ИНКРЕТИНОВОГО РЯДА

Нарушение секреции инкретиновых гормонов и сниженный инкретиновый эффект являются причинами прогрессирования гипергликемии у пациентов с классическим СД2. Стимуляция выработки гормонов инкретинового ряда, в частности глюкагоноподобного пептида-1 (ГПП-1), ведет к компенсации углеводного обмена [54, 55]. Воздействие на этот механизм реализуется при назначении инкретин-направленной терапии [56, 57].

Для того чтобы проверить гипотезу о возможной роли гормонов инкретинового ряда в ремиссии СД2, было проведено клиническое исследование, в которое были включены пациенты с длительным анамнезом СД2 и ожирения (более 10–15 лет), получавшие терапию агонистом рецептора ГПП-1 лираглутидом в дозе, имитирующей максимальный инкретиновый эффект. Через 3–4 мес после получения препарата у пациентов было отмечено среднее снижение массы тела на 6,2 кг, гликированного гемоглобина крови (HbA_{1c}) на 1,1% и повышение М-индекса с 1,74 мг/кг/мин до 2,52 мг/кг/мин, что говорит о снижении выраженности ИР и перспективах использования инкретин-направленной терапии для коррекции ИР у больных с СД2.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Общая последовательность развития событий в патогенезе СД2 довольно понятна (рис. 2). Первичные факторы риска, включающие ожирение, воспаление и стресс различной природы, ведут к развитию ИР в клетках-мишенях инсулина. В классическом варианте в адипоцитах жировой ткани все факторы риска ИР действуют через единый механизм, связанный с латентным воспалением и хронической активацией стресс-зависимых киназ, таких как JNK и IKK. Они фосфорилируют субстрат инсулинового рецептора IRS, нарушая активацию инсулинового каскада и выход глюкозного транспортера Glut4 на поверхность клеток (см. рис. 1B). На молекулярном уровне ИР проявляется в снижении инсулинзависимого фосфорилирования компонентов инсулинового каскада, киназы Akt и белка AS160 (см. рис. 1Г). Наши данные подтверждают, что сайт-специфичное фосфорилирование Akt, AS160 и JNK может служить молекулярным маркером ИР в адипоцитах.

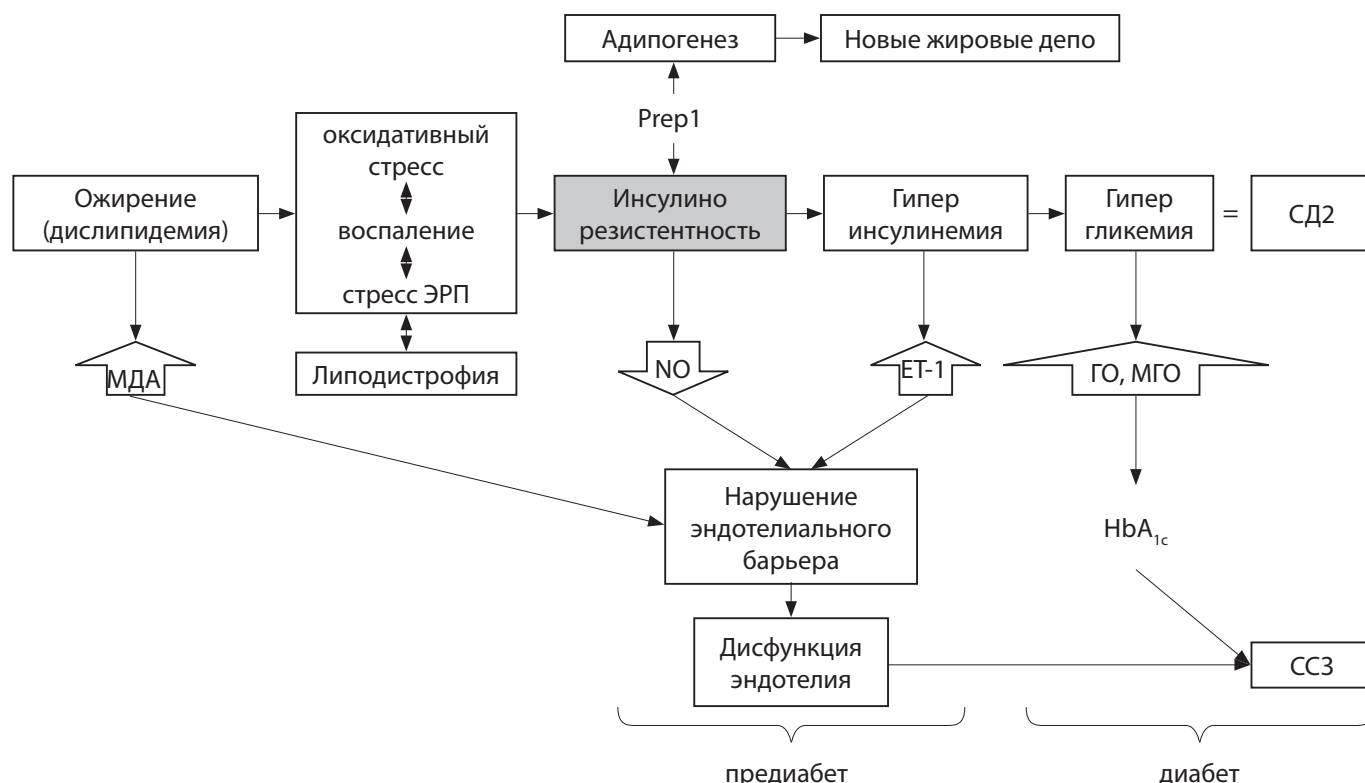


Рис. 2. Общая схема патогенеза сахарного диабета 2 типа и ассоциированных сердечно-сосудистых осложнений.

Липодистрофия представляет неклассический вариант патогенеза СД₂, по крайней мере, в отношении жировой ткани. Наши и другие исследования определяют четкую связь между липодистрофией и ИР, но причинно-следственные взаимоотношения и патогенез СД₂ при липодистрофии остаются малопонятными и требуют отдельных исследований.

Избыток свободных жирных кислот вследствие ожирения является важной причиной ИР и карбонильного стресса, повышая риск дисфункции сосудистого эндотелия и сердечно-сосудистых осложнений уже на первых стадиях патогенеза СД₂. Активируя толл-подобные рецепторы TLR4, СЖК запускают воспалительные каскады и развитие ИР в адипоцитах. Кроме того, в клетках СЖК подвергаются перекисному окислению с образованием МДА как одного из продуктов. Физически воздействуя на эндотелий и модифицируя ряд белков, МДА изменяет структуру цитоскелета и межклеточных контактов, нарушая барьерные свойства эндотелия и повышая риск развития отеков, гипертонических осложнений и ангиопатий. Прогрессирование патологического процесса ведет к устойчивой гипергликемии и карбонильному стрессу за счет активных продуктов распада глюкозы. ГО и МГО химически модифицируют другие белки плазмы и клеток крови, что согласуется с повышением HbA_{1c}.

sHSP защищают клетки от окислительного стресса и апоптоза на первых этапах патогенеза СД₂, препятствуя агрегации денатурированных белков и развитию стресса ЭРП. Вместе с тем sHSP являются мишенью карбонильного стресса при гипергликемии, что ведет к изменению их структуры и функциональных свойств, уменьшению шапероноподобной активности и защитного действия. Тем самым sHSP могут опосредовать обратную связь от конечных к начальным этапам патогенеза СД₂, усиливая эффекты оксидативного стресса и стресса ЭРП.

Персистирующая ИР запускает отложенные, длительные адаптационные процессы в организме; они ведут к перестройке всего метаболизма в процессе развития СД₂. Такие длительные изменения закрепляются на транскрипционном уровне, где ключевую роль играют различные транскрипционные факторы. При этом направление перестроек часто определяется совокупным воздействием регуляторов транскрипции и внешних факторов. Например, в условиях гипергликемии может усиливаться экспрессия Prep1 в миоцитах, что снижает чувствительность мышц к инсулину и утилизацию ими глюкозы, но выполняет защитную функцию. Аналогичную роль может играть Prep1 в адипоцитах, где он также ослабляет чувствительность к инсулину и захват глюкозы, предотвращая жировую перегрузку адипоцитов. В этой связи важно, что Prep1 участвует в регуляции адипогенеза, то есть он также подавляет процесс формирования новых жировых депо. В совокупности системный эффект Prep1 можно расценивать как компенсаторное отключение инсулиновой зависимости клеток в условиях гиперинсулиемии и пищевой перегрузки. Дальнейшие исследования должны быть направлены на валидацию Prep1 как терапевтической биомаркера в животных моделях и поиск способов направленного воздействия на его экспрессию в инсулинчувствительных тканях.

Очевидно, что патогенез СД₂ гораздо более сложен, чем схематично показанный на рис. 2. Определение других его участников и механизмов, безусловно, требует продолжения исследований.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Финансирование исследования. Обзорная работа подготовлена в рамках реализации научной программы, поддержанной грантом Российского научного фонда (проект №14-35-00026).

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

Участие авторов. Дедов И.И. – концепция исследования, редактирование и финальное утверждение рукописи; Ткачук В.А. – дизайн экспериментальной части исследования, анализ результатов, написание текста; Гусев Н.Б. – дизайн экспериментальной части исследования, анализ результатов, написание текста; Ширинский В.П. – дизайн экспериментальной части исследования, анализ результатов, написание текста; Воронников А.В. – дизайн экспериментальной части исследования, анализ результатов, написание текста; Кочегура Т.Н. – анализ клинико-экспериментальных результатов исследования, написание текста, редактирование рукописи; Майоров А.Ю. – разработка дизайна проекта, формирование групп пациентов, набор клинического материала, анализ и интерпретация результатов, написание текста; Шестакова М.В. – разработка дизайна клинической части исследования, анализ и интерпретация результатов, написание и редактирование текста.

Благодарности. Авторы приносят благодарность за участие в исследовании:

сотрудникам ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Минздрава России – д.м.н., профессору Тюльпакову А.Н., д.м.н., профессору Кураевой Т.Л., к.м.н. Соркиной Е.Л., к.м.н. Шестаковой Е.А., Филиппову Ю.И., аспиранту Кокшаровой Е.О., аспиранту Склянику И.А., аспиранту Мишиной Е.Е., Горельшеву А.С.;

сотрудникам Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова – к.м.н. Акопян Ж.А., к.б.н. Егорову А.Д., к.б.н. Кулебякину К.Ю., Степановой А.В., к.б.н. Судницыной М.В., к.б.н. Дацкевич П.Н., к.б.н. Нефедовой В.В., Рыжавской А.С., аспиранту Мурановой Л.К., Герасимович Е.С.; сотрудникам ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации – к.ф.м.н. Пенькову Д.Н., к.б.н. Хапчаеву А.Ю.

Авторы выражают искреннюю благодарность д.м.н. Плехановой О.С. за помощь в подготовке рукописи.

Все авторы внесли существенный вклад в проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Ткачук В.А., Воронников А.В. Молекулярные механизмы развития резистентности к инсулину // *Сахарный диабет*. –2014. –Т. 17. – №2. –С. 29-40. [Tkachuk VA, Voronnikov AV. Molecular Mechanisms of Insulin Resistance Development. *Diabetes mellitus*. 2014;17(2):29-40. (In Russ.)] doi: 10.14341/DM2014229-40
2. Lackey DE, Olefsky JM. Regulation of metabolism by the innate immune system. *Nat Rev Endocrinol*. 2016;12(1):15-28. doi: 10.1038/nrendo.2015.189
3. Stafeev IS, Menshikov MY, Tsokolaeva ZI, et al. Molecular Mechanisms of Latent Inflammation in Metabolic Syndrome. Possible Role of Sirtuins and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Type gamma. *Biochemistry (Mosc)*. 2015;80(10):1217-1226. doi: 10.1134/S0006297915100028
4. Boura-Halfon S, Zick Y. Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009;296(4):E581-591. doi: 10.1152/ajpendo.90437.2008
5. Morino K, Petersen KF, Shulman GI. Molecular mechanisms of insulin resistance in humans and their potential links with mitochondrial dysfunction. *Diabetes*. 2006;55 Suppl 2:S9-S15. doi: 10.2337/db06-S002
6. Samuel VT, Petersen KF, Shulman GI. Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism. *Lancet*. 2010;375(9733):2267-2277. doi: 10.1016/s0140-6736(10)60408-4
7. Liu YF, Herschkovitz A, Boura-Halfon S, et al. Serine phosphorylation proximal to its phosphotyrosine binding domain inhibits insulin receptor substrate 1 function and promotes insulin resistance. *Mol Cell Biol*. 2004;24(21):9668-9681. doi: 10.1128/MCB.24.21.9668-9681.2004
8. Zick Y. Uncoupling insulin signalling by serine/threonine phosphorylation: a molecular basis for insulin resistance. *Biochem Soc Trans*. 2004;32(Pt 5):812-816. doi: 10.1042/BST0320812
9. Hojlund K. Metabolism and insulin signaling in common metabolic disorders and inherited insulin resistance. *Dan Med J*. 2014;61(7):B4890.
10. Stafeev IS, Voronnikov AV, Ratner EI, et al. Latent Inflammation and Insulin Resistance in Adipose Tissue. *Int J Endocrinol*. 2017;2017:5076732. doi: 10.1155/2017/5076732
11. Toth AE, Toth A, Walter FR, et al. Compounds blocking methylglyoxal-induced protein modification and brain endothelial injury. *Arch Med Res*. 2014;45(8):753-764. doi: 10.1016/j.arcmed.2014.10.009
12. Eizirik DL, Cardozo AK, Cnop M. The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. *Endocr Rev*. 2008;29(1):42-61. doi: 10.1210/er.2007-0015
13. Mitra A, Basak T, Datta K, et al. Role of alpha-crystallin B as a regulatory switch in modulating cardiomyocyte apoptosis by mitochondrial or endoplasmic reticulum during cardiac hypertrophy and myocardial infarction. *Cell Death Dis*. 2013;4:e582. doi: 10.1038/cddis.2013.114
14. Mymrikov EV, Seit-Nebi AS, Gusev NB. Large potentials of small heat shock proteins. *Physiol Rev*. 2011;91(4):1123-1159. doi: 10.1152/physrev.00023.2010
15. Kumano M, Furukawa J, Shiota M, et al. Cotargeting stress-activated Hsp27 and autophagy as a combinatorial strategy to amplify endoplasmic reticular stress in prostate cancer. *Mol Cancer Ther*. 2012;11(8):1661-1671. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-12-0072
16. Simar D, Jacques A, Caillaud C. Heat shock proteins induction reduces stress kinases activation, potentially improving insulin signalling in monocytes from obese subjects. *Cell Stress Chaperones*. 2012;17(5):615-621. doi: 10.1007/s12192-012-0336-4
17. van Heijst JW, Niessen HW, Musters RJ, et al. Argpyrimidine-modified Heat shock protein 27 in human non-small cell lung cancer: a possible mechanism for evasion of apoptosis. *Cancer Lett*. 2006;241(2):309-319. doi: 10.1016/j.canlet.2005.10.042
18. Derham BK, Harding JJ. Effects of modifications of alpha-crystallin on its chaperone and other properties. *Biochem J*. 2002;364(Pt 3):711-717. doi: 10.1042/BJ20011512
19. Choi JH, Banks AS, Estall JL, et al. Anti-diabetic drugs inhibit obesity-linked phosphorylation of PPARgamma by Cdk5. *Nature*. 2010;466(7305):451-456. doi: 10.1038/nature09291
20. Oriente F, Fernandez Diaz LC, Miele C, et al. Prep1 deficiency induces protection from diabetes and increased insulin sensitivity through a p160-mediated mechanism. *Mol Cell Biol*. 2008;28(18):5634-5645. doi: 10.1128/MCB.00117-08
21. Oriente F, Cabaro S, Liotti A, et al. PREP1 deficiency downregulates hepatic lipogenesis and attenuates steatohepatitis in mice. *Diabetologia*. 2013;56(12):2713-2722. doi: 10.1007/s00125-013-3053-3
22. Penkov DN, Egorov AD, Mozgovaya MN, Tkachuk VA. Insulin resistance and adipogenesis: role of transcription and secreted factors. *Biochemistry (Mosc)*. 2013;78(1):8-18. doi: 10.1134/S0006297913010021
23. Erickson HP. Irisin and FNDC5 in retrospect: An exercise hormone or a transmembrane receptor? *Adipocyte*. 2013;2(4):289-293. doi: 10.4161/adip.26082
24. Bostrom P, Wu J, Jedrychowski MP, et al. A PGC1-alpha-dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature*. 2012;481(7382):463-468. doi: 10.1038/nature10777
25. Nedergaard J, Wang Y, Cannon B. Cell proliferation and apoptosis inhibition: essential processes for recruitment of the full thermogenic capacity of brown adipose tissue. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2018. doi: 10.1016/j.bbalip.2018.06.013
26. Lidell ME, Betz MJ, Enerback S. Brown adipose tissue and its therapeutic potential. *J Intern Med*. 2014;276(4):364-377. doi: 10.1111/joim.12255
27. Sidossis L, Kajimura S. Brown and beige fat in humans: thermogenic adipocytes that control energy and glucose homeostasis. *J Clin Invest*. 2015;125(2):478-486. doi: 10.1172/JCI78362
28. Wu J, Bostrom P, Sparks LM, et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*. 2012;150(2):366-376. doi: 10.1016/j.cell.2012.05.016

29. Giralto M, Villarroya F. White, brown, beige/brite: different adipose cells for different functions? *Endocrinology*. 2013;154(9):2992-3000. doi: 10.1210/en.2013-1403
30. Carobbio S, Guenantin AC, Samuelson I, et al. Brown and beige fat: From molecules to physiology and pathophysiology. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2018. doi: 10.1016/j.bbalip.2018.05.013
31. Cypess AM, Lehman S, Williams G, et al. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med*. 2009;360(15):1509-1517. doi: 10.1056/NEJMoa0810780
32. Cypess AM, Haft CR, Laughlin MR, Hu HH. Brown fat in humans: consensus points and experimental guidelines. *Cell Metab*. 2014;20(3):408-415. doi: 10.1016/j.cmet.2014.07.025
33. Hany TF, Steinert HC, Goerres GW, et al. PET diagnostic accuracy: improvement with in-line PET-CT system: initial results. *Radiology*. 2002;225(2):575-581. doi: 10.1148/radiol.2252011568
34. Karlas A, Reber J, Liapis E, et al. Multispectral Optoacoustic Tomography of Brown Adipose Tissue. *Handb Exp Pharmacol*. 2018. doi: 10.1007/164_2018_141
35. Groop LC, Widén E, Ferrannini E. Insulin resistance and insulin deficiency in the pathogenesis of Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: errors of metabolism or of methods? *Diabetologia*. 1993;36(12):1326-1331. doi: 10.1007/bf00400814
36. Майоров А.Ю., Урбанова К.А., Галстян Г.Р. Методы количественной оценки инсулинорезистентности // *Ожирение и метаболизм*. –2009. –Т. 6. –№2. –С. 19-23. [Mayorov AY, Urbanova KA, Galstyan GR. Methods for quantitative assessment of insulin resistance. *Obesity and metabolism*. 2009;6(2):19-23. (In Russ.)] doi: 10.14341/2071-8713-5313
37. Sorkina E, Frolova E, Rusinova D, et al. Progressive Generalized Lipodystrophy as a Manifestation of Autoimmune Polyglandular Syndrome Type 1. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;101(4):1344-1347. doi: 10.1210/jc.2015-3722
38. Судницына М.В., Гусев И.Б. Малые белки теплового шока и диабет // *Вестник Московского университета. Серия 16: Биология*. –2015. –№2. –С. 24-30. [Sudnitsyna MV, Gusev NB. Small heat shock proteins and diabetes. *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 16. Biologiya*. 2015;(2):24-30. (In Russ.)]
39. Судницына М.В., Гусев Н.Б. Метилглиоксаль и малые белки теплового шока // *Биохимия*. –2017. –Т. 82. –№7. –С. 987-997. [Sudnitsyna MV, Gusev NB. Methylglyoxal and small heat shock proteins. *Biochemistry*. 2017;82(7):987-997. (In Russ.)]
40. Muranova LK, Perfilov MM, Serebryakova MV, Gusev NB. Effect of methylglyoxal modification on the structure and properties of human small heat shock protein HspB6 (Hsp20). *Cell Stress Chaperones*. 2016;21(4):617-629. doi: 10.1007/s12192-016-0686-4
41. Sluchanko NN, Chebotareva NA, Gusev NB. Quaternary structure of human small heat shock protein HSPB6 (Hsp20) in crowded media modeled by trimethylamine N-oxide (TMAO): Effect of protein phosphorylation. *Biochimie*. 2015;108:68-75. doi: 10.1016/j.biochi.2014.11.001
42. Weeks SD, Muranova LK, Heirbaut M, et al. Characterization of human small heat shock protein HSPB1 alpha-crystallin domain localized mutants associated with hereditary motor neuron diseases. *Sci Rep*. 2018;8(1):688. doi: 10.1038/s41598-017-18874-x
43. Muranova LK, Weeks SD, Strelkov SV, Gusev NB. Characterization of Mutants of Human Small Heat Shock Protein HspB1 Carrying Replacements in the N-Terminal Domain and Associated with Hereditary Motor Neuron Diseases. *PLoS One*. 2015;10(5):e0126248. doi: 10.1371/journal.pone.0126248
44. Samsonov MV, Khapchaev AY, Vorotnikov AV, et al. Impact of Atherosclerosis- and Diabetes-Related Dicarboxyls on Vascular Endothelial Permeability: A Comparative Assessment. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:1625130. doi: 10.1155/2017/1625130
45. Maroni G, Tkachuk VA, Egorov A, et al. Prep1 prevents premature adipogenesis of mesenchymal progenitors. *Sci Rep*. 2017;7(1):15573. doi: 10.1038/s41598-017-15828-1
46. Kulebyakin K, Penkov D, Blasi F, et al. The transcription factor Prep1 controls hepatic insulin sensitivity and gluconeogenesis by targeting nuclear localization of FOXO1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;481(1-2):182-188. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.10.146
47. Ciccarelli M, Vastolo V, Albano L, et al. Glucose-induced expression of the homeotic transcription factor Prep1 is associated with histone post-translational modifications in skeletal muscle. *Diabetologia*. 2016;59(1):176-186. doi: 10.1007/s00125-015-3774-6
48. Соркина Е.Л. *Наследственные липодистрофии: клинические, гормональные и молекулярно-генетические характеристики*: Автореф. дис... канд. мед. наук. –М.; 2017. [Sorokina EL. *Nasledstvennye lipodistrofii: klinicheskie, gormonalnye i molekulyarno-geneticheskie kharakteristiki*. [dissertation] Moscow; 2017.
49. Соркина Е.Л., Калашникова М.В., Мельниченко Г.А., Тюльпаков А.Н. Семейная парциальная липодистрофия (синдром Dunnigan) вследствие мутации в гене LMNA: первое описание клинического случая в России // *Терапевтический архив*. –2015. –№3. –С. 83-86. [Sorkina EL, Kalashnikova MV, Melnichenko GA, Tyulpakov AN. Familial partial lipodystrophy (Dunnigan syndrome) due to LMNA gene mutation: The first description of its clinical case in Russia. *Ter Arkh*. 2015;(3):83-86. (In Russ.)] doi: 10.17116/terarkh201587383-87
50. Соркина Е.Л., Калашникова М.Ф., Лиходей Н.В., и др. Развитие метаболического синдрома в молодом возрасте как проявление семейной парциальной липодистрофии 3 типа (дефект гена PPAR γ): первое описание клинического случая в России // *Сахарный диабет*. –2015. –Т. 18. –№3. –С. 99-105. [Sorkina EL, Kalashnikova MF, Likhodey NV, et al. Development of metabolic syndrome at a young age as a manifestation of familial partial lipodystrophy type 3 (PPAR γ mutation): the first description of its clinical case in Russia. *Diabetes mellitus*. 2015;18(3):99-105. (In Russ.)] doi: 10.14341/DM2015399-105
51. Sorkina E, Frolova E, Rusinova D, et al. Progressive Generalized Lipodystrophy as a Manifestation of Autoimmune Polyglandular Syndrome Type 1. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;101(4):1344-1347. doi: 10.1210/jc.2015-3722
52. Hussain I, Patni N, Ueda M, et al. A Novel Generalized Lipodystrophy-Associated Progeroid Syndrome Due to Recurrent Heterozygous LMNA p.T10I Mutation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2018;103(3):1005-1014. doi: 10.1210/jc.2017-02078
53. Brown RJ, Araujo-Vilar D, Cheung PT, et al. The Diagnosis and Management of Lipodystrophy Syndromes: A Multi-Society Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;101(12):4500-4511. doi: 10.1210/jc.2016-2466
54. Giorda CB, Sacerdote C, Nada E, et al. Incretin-based therapies and acute pancreatitis risk: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Endocrine*. 2015;48(2):461-471. doi: 10.1007/s12020-014-0386-8
55. Mannucci E, Monami M. Cardiovascular Safety of Incretin-Based Therapies in Type 2 Diabetes: Systematic Review of Integrated Analyses and Randomized Controlled Trials. *Adv Ther*. 2017;34(1):1-40. doi: 10.1007/s12325-016-0432-4
56. Xie W, Song X, Liu Z. Impact of dipeptidyl-peptidase 4 inhibitors on cardiovascular diseases. *Vascul Pharmacol*. 2018;109:17-26. doi: 10.1016/j.vph.2018.05.010
57. Gomes GKA, de Camargos Ramos AI, de Sousa CT, et al. Linaagliptin safety profile: A systematic review. *Prim Care Diabetes*. 2018. doi: 10.1016/j.pcd.2018.04.006

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ [AUTHORS INFO]

***Кочегура Татьяна Николаевна**, д.м.н., с.н.с. [Tatiana N. Kochegura, MD, PhD, senior research associate]; адрес: 119991, Ломоносовский пр-т, д. 27, корп. 10 [address: 27c10, Lomonosovskiy prospect, Moscow, 119991 Russian Federation]; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4869-4051>; eLibrary SPIN: 7122-3731; e-mail: t_kochegur@mail.ru

Дедов Иван Иванович, д.м.н., профессор, академик РАН [Ivan I. Dedov, MD, PhD, Professor]; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8175-7886>; eLibrary SPIN: 5873-2280; e-mail: dedov@endocrincentr.ru
Ткачук Всеволод Арсеньевич, д.б.н., профессор, академик РАН [Vsevolod A. Tkachuk, PhD, Professor]; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7492-747X>; eLibrary SPIN: e-mail: tkachuk@fbm.msu.ru

Гусев Николай Борисович, д.б.н., профессор [Nikolai B. Gusev, PhD, Professor]

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9779-6273>; eLibrary SPIN: 1776-6606; e-mail: nbgusev@mail.ru

Ширинский Владимир Павлович, д.б.н., профессор [Vladimir P. Shirinsky, PhD, Professor];

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4643-5507>; eLibrary SPIN: 7931-8896; e-mail: shirinsky@cardio.ru

Воротников Александр Вячеславович, к.б.н., в.н.с. [Aleksandr V. Vorotnikov, PhD in Biology, leader research associate];

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1460-971X>; eLibrary SPIN: 4067-4478; e-mail: a.vorotnikov@cardio.ru

Майоров Александр Юрьевич, д.м.н. [Aleksander Y. Mayorov, MD, PhD]; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5825-3287>;

eLibrary SPIN: 4275-7779; e-mail: education@endocrincentr.ru

Шестакова Марина Владимировна, д.м.н., профессор, академик РАН [Marina V. Shestakova, MD, PhD, Professor];

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5057-127X>; eLibrary SPIN: 7584-7015; e-mail: nephro@endocrincentr.ru

ЦИТИРОВАТЬ:

Дедов И.И., Ткачук В.А., Гусев Н.Б., Ширинский В.П., Воротников А.В., Кочегура Т.Н., Майоров А.Ю., Шестакова М.В. Сахарный диабет 2 типа и метаболический синдром: молекулярные механизмы, ключевые сигнальные пути и определение биомаркеров для новых лекарственных средств // *Сахарный диабет*. — 2018. — Т. 21. — №5. — С. 364-375. doi: 10.14341/DM9730

TO CITE THIS ARTICLE:

Dedov II, Tkachuk VA, Gusev NB, Shirinsky VP, Vorotnikov AV, Kochegura TN, Mayorov AY, Shestakova MV. Type 2 diabetes and metabolic syndrome: identification of the molecular mechanisms, key signaling pathways and transcription factors aimed to reveal new therapeutical targets. *Diabetes Mellitus*. 2018;21(5):364-375. doi: 10.14341/DM9730