

На правах рукописи

СТАФЕЕВ ЮРИЙ СЕРГЕЕВИЧ

**ВОЗДЕЙСТВИЕ НА ВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ СТАТУС АДИПОЦИТОВ
КАК ПОДХОД К РЕГУЛЯЦИИ ИХ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К
ИНСУЛИНУ**

03.01.04 – Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2019

Работа выполнена в ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», Факультет фундаментальной медицины, кафедра биохимии и молекулярной медицины и в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Минздрава РФ, лаборатория ангиогенеза

Научный руководитель: доктор медицинских наук, профессор
Парфёнова Елена Викторовна

Научный консультант: доктор биологических наук
Меньшиков Михаил Юрьевич

Официальные оппоненты: **Купраш Дмитрий Владимирович**,
доктор биол. наук., проф., чл.-корр. РАН,
ФГБУН «НИИ молекулярной биологии им.
В.А.Энгельгардта» РАН, лаборатория
передачи внутриклеточных сигналов в норме
и патологии, главный научный сотрудник

Попов Даниил Викторович,
кандидат биол. наук, Государственный
научный центр РФ «Институт медико-
биологических проблем» РАН, лаборатория
физиологии мышечной деятельности,
ведущий научный сотрудник, и.о.
заведующего лабораторией

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биологии развития им. Н.К.Кольцова» РАН

Защита состоится «26» сентября 2019 года в 11 часов на заседании диссертационного совета Д 001.010.01 в ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» по адресу: Россия, Москва, ул. Погодинская, д.10, стр.8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИБМХ и на сайте www.ibmc.msk.ru.

Автореферат разослан «__» _____ 2019 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат химических наук

Карпова Е.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы

По данным ВОЗ, ожирение и ассоциированные с ним метаболические заболевания, такие как метаболический синдром и сахарный диабет 2 типа (СД2Т), становятся одной из основных причин смертности в современном мире. Главной причиной развития ожирения является нарушение баланса между расходом и потреблением энергии. Избыток поступающих нутриентов откладывается в состав жировой ткани, что способствует увеличению ее массы и развитию ожирения. В условиях ожирения в жировой ткани происходит развитие гипоксии, стресса ЭПР и окислительного стресса, что по различным механизмам активирует основной воспалительный транскрипционный фактор NF- κ B, секрецию провоспалительных цитокинов и формирует латентное воспаление жировой ткани.

Адиipoциты – не единственный тип клеток, составляющих жировую ткань. Помимо этого в составе жировой ткани присутствуют прогениторные клетки, иммунные клетки, клетки стромы, сосудов жировой ткани и многие другие. В настоящее время известно, что прогениторные клетки жировой ткани меняют свои ангиогенные, регенеративные и другие свойства в условиях гипергликемии и СД2Т. Однако, роль нарушений функционирования прогениторных клеток жировой ткани в формировании инсулиновой резистентности к настоящему времени изучена недостаточно. Поэтому в нашей работе мы оценивали состояние прогениторных клеток жировой ткани в ассоциации с состоянием иммунных клеток жировой ткани у пациентов с ожирением и наличием/отсутствием СД2Т.

Воспалительный фон способен критически влиять на инсулиновую чувствительность адипоцитов. В норме, инсулин, действуя на адипоцит, связывается со своим рецептором (IR) и вызывает каскад активации основных участников инсулиновой сигнализации: субстрата инсулинового рецептора 1 типа (IRS-1), протеинкиназы В (Akt) и субстрата Akt молекулярной массой 160 кДа (AS160). Каскад последовательных фосфорилирований основных участников вызывает транслокацию инсулин-зависимого переносчика глюкозы GLUT4 в плазматическую мембрану, через который глюкоза в ответ на инсулин поступает в клетку. Нарушения в сигнальном каскаде инсулина вызывают состояние, когда при действии инсулина адипоцит не может провести сигнал до стадии транслокации GLUT4. Данное состояние называется инсулиновой резистентностью (ИР).

Формирование инсулиновой резистентности адипоцитов тесно связано с наличием латентного воспаления жировой ткани. Одним из основных

механизмов является снижение активирующего тирозинового фосфорилирования IR и IRS-1 за счет конкурентного ингибирующего серин/треонинового фосфорилирования IR и IRS-1. Таким образом, проведение сигнала нарушается на начальных участках инсулиновой сигнализации. Основными киназами, осуществляющими ингибирующее серин/треониновое фосфорилирование, являются стресс-активируемые киназы, среди которых есть 2 основные киназы, активирующиеся воспалением – JNK и IKK. Таким образом, латентное воспаление жировой ткани способно нарушать инсулиновую чувствительность адипоцитов.

В последние годы активно разрабатывается новый подход к противовоспалительной терапии СД2Т – активация естественных противовоспалительных сигнальных каскадов для подавления воспаления. Классическими противовоспалительными цитокинами являются ИЛ-4 и ИЛ-13, которые, активируя транскрипционный фактор STAT6, запускают экспрессию противовоспалительных генов. К настоящему моменту, получены убедительные данные позитивного воздействия на инсулиновую чувствительность ИЛ-4 в животной модели высокожировой диеты, что опосредовано активацией миелоидной тирозингидроксилазы и формированием бежевой жировой ткани. Тем не менее, механизм действия и эффекты ИЛ-4 при воздействии непосредственно на зрелые адипоциты в состоянии инсулиновой резистентности остаются неизвестными.

Цель исследования

Оценить влияние воспалительного статуса адипоцитов на системном и клеточном уровне в формировании инсулиновой резистентности, а также возможность воздействия на инсулиновую чувствительность адипоцитов путем коррекции их воспалительного статуса.

Задачи исследования

1. Оценить влияние различных химических индукторов метаболического стресса на формирование ИР и активацию киназы JNK1/2.
2. Получить клеточные линии МСК ЖТ пациентов с ожирением и наличием/отсутствием СД2Т из биоптатов жировой ткани.
3. Сравнить иммунофенотип тотальной популяции макрофагов жировой ткани пациентов с ожирением и наличием/отсутствием СД2Т.
4. Сравнить пролиферативную активность, способность к адипогенной дифференцировке и воспалительный статус МСК ЖТ пациентов с ожирением и наличием/отсутствием СД2Т.

5. Оценить воздействие противовоспалительного цитокина ИЛ-4 в виде рекомбинантного белка и генно-инженерной конструкции на инсулиновую чувствительность зрелых адипоцитов 3Т3-L1.

6. Проанализировать возможные механизмы воздействия ИЛ-4 на инсулиновую чувствительность зрелых адипоцитов 3Т3-L1.

Научная новизна

Проведено исследование биоптатов подкожной и сальниковой жировой ткани пациентов с ожирением и наличием/отсутствием СД2Т. Охарактеризованы морфология адипоцитов, суммарная инфильтрация макрофагами, а также проведен субпопуляционный анализ общей популяции макрофагов жировой ткани с анализом инфильтрации М1- и М2-подобными макрофагами. Установлено, что пациенты с ожирением и наличием СД2Т имеют гипертрофический тип развития жировой ткани обоих типов (увеличенный размер адипоцитов), повышенную инфильтрацию макрофагами и смещенный общий иммунофенотип макрофагов жировой ткани в провоспалительном направлении.

Проанализированы свойства МСК ЖТ пациентов с ожирением и наличием/отсутствием СД2Т. Продемонстрированы различия в пролиферативном статусе МСК ЖТ: как МСК подкожной жировой ткани, так и сальниковой пациентов с ожирением и наличием СД2Т значительно хуже пролиферируют, а также имеют меньшее число клеток в G2/S фазе клеточного цикла. Помимо этого, МСК ЖТ пациентов с ожирением и наличием СД2Т обладают сниженной способностью к адипогенной дифференцировке, а также имеют повышенный уровень воспаления.

Для изучения возможности коррекции воспалительного статуса зрелых инсулинорезистентных адипоцитов был проведен сравнительный анализ химического моделирования патологических процессов, ассоциированных с метаболическим стрессом: гиперлипидемии, острого воспаления, стресса ЭПР, гипоксии. В ходе работы было показано, что все индукторы метаболического стресса в той или иной степени способны снижать инсулиновую чувствительность, при этом кинетику латентного воспаления имеют действия на адипоциты свободных жирных кислот (модель гиперлипидемии) и брефелдина А (модель стресса ЭПР).

Изучено действие противовоспалительного цитокина ИЛ-4 на состояние инсулиновой чувствительности адипоцитов в модели липид-индуцируемой инсулинорезистентности. Показано, что рекомбинантный ИЛ-4 в концентрации 50 нг/мл восстанавливает инсулиновую чувствительность зрелых адипоцитов до уровня контроля. В ходе работы с генно-инженерным

вариантом ИЛ-4 продемонстрировано, что адипоциты, трансдуцированные геном ИЛ-4 становятся невосприимчивыми к липидной индукции инсулиновой резистентности.

В ходе работы проанализирована классическая сигнализация ИЛ-4 на зрелых адипоцитах. Впервые продемонстрирована быстрая транслокация транскрипционного фактора STAT6 в ядро, с дальнейшим исчезновением данного эффекта при действии ИЛ-4 более 1 часа. Данные по транслокации STAT6 соответствуют данным по фосфорилированию транскрипционного фактора STAT6.

Практическая значимость

В рамках проведенного исследования получен массив данных, демонстрирующий важную роль воспаления в формировании инсулиновой резистентности жировой ткани. Благодаря полученным данным, вновь поднимается вопрос о разработке эффективных противовоспалительных подходов к коррекции инсулинорезистентности жировой ткани. Впервые получены данные, свидетельствующие о роли МСК ЖТ в формировании СД2Т, что позволит разработать новые подходы к коррекции инсулиновой резистентности через регуляцию пролиферативных свойств МСК ЖТ.

В работе убедительно показан непосредственный характер действия противовоспалительного цитокина ИЛ-4 на зрелые адипоциты, не опосредуемый иными типами клеток, что дополняет имеющиеся мировые данные по механизмам действия ИЛ-4 на жировую ткань. Продемонстрирован потенциал практического применения генно-инженерного варианта ИЛ-4 в качестве генно-терапевтического препарата для коррекции инсулиновой резистентности жировой ткани.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Подкожная и сальниковая жировые ткани пациентов с СД2Т имеют повышенный уровень воспаления и гипертрофию адипоцитов.
2. МСК подкожной и сальниковой жировых тканей пациентов с СД2Т имеют сниженный пролиферативный потенциал, а также сниженную способность к адипоцитарной дифференцировке.
3. Рекombинантный ИЛ-4 в концентрации 50 нг/мл восстанавливает инсулиновую чувствительность адипоцитов в модели липид-индуцируемой ИР.
4. Эндогенная экспрессия зрелыми адипоцитами ИЛ-4 защищает адипоциты от формирования липид-индуцированной ИР.

5. Действие ИЛ-4 на зрелые адипоциты опосредуется активирующим фосфорилированием pSTAT6-Y641 с последующей ядерной транслокацией STAT6, а также фосфорилированиями pIRS-Y612, pAkt-S473.

Степень достоверности результатов проведенных исследований

Данная работа выполнена на высоком методическом уровне с использованием современных аналитических и статистических методов. Приведенные в работе научные положения и выводы по полученным результатам основаны на достоверных данных. Достоверность результатов обусловлена необходимым числом наблюдений, а также использованием современных статистических методов.

Апробация работы

Основные результаты и положения работы были представлены и обсуждены на российских и международных конференциях, среди которых 5th Annual Meeting of International Cytokine and Interferon Society (Japan, Kanazawa, 2017), XVIII Annual Meeting of International Society of Stem Cell Research 2018 (Australia, Melbourne, 2018), 16th World Congress of Insulin Resistance, Diabetes and Cardiovascular Diseases (USA, Los Angeles, 2018), III Национальный Конгресс по Регенеративной Медицине (Россия, Москва, 2017).

Публикации

Соискатель имеет 24 опубликованные печатные работы по теме диссертации, в том числе 5 статей в журналах, индексируемых в Scopus и Web of Science, 19 тезисов докладов.

Связь работы с научными программами

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ №16-34-00282 (руководитель проекта Стафеев Ю.С.), 17-34-80026 (руководитель проекта Стафеев Ю.С.), 15-04-07840 (руководитель проекта д.б.н. Меньшиков М.Ю.) и гранта РНФ №17-15-01435 (руководитель проекта академик РАН, д.м.н. Шестакова М.В.).

Объем и структура научно-квалификационной работы

Научно-квалификационная работа изложена на 155 страницах, состоит из введения, четырех глав (обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение результатов), выводов и списка литературы, включающего 260 публикаций отечественных и иностранных авторов. Научно-квалификационная работа иллюстрирована 3 таблицами и 26 рисунками.

Личный вклад автора

Автором лично проведен сбор и анализ данных литературы, постановка задач исследования и планирование экспериментов, а также выполнение всей экспериментальной работы, связанной с биопсийным и клеточным материалами. Автор лично проводил анализ полученных результатов, готовил публикации в научные журналы по полученному экспериментальному материалу, а также представлял результаты работы на научных конференциях.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1.1. Клиническая характеристика больных, включенных в исследование.

Критерии включения пациентов в исследование: ожирение II-III степени ($\text{ИМТ} > 35 \text{ кг/м}^2$) с длительным течением (более 15 лет). Критерии исключения пациентов: возраст менее 18 лет, наличие любых других типов сахарного диабета, наличие воспалительного процесса, наличие онкологического процесса, беременность. В исследование были включены 10 пациентов, отобранных в соответствии с критериями включения и исключения; из 10 пациентов 5 имели нормальную глюкозную толерантность, 5 имели установленный диагноз сахарного диабета 2 типа.

Всем пациентам, включенным в исследование, на базе Института Диабета Национального медицинского исследовательского центра эндокринологии Минздрава РФ проводили оценку стандартных клинических показателей, среди которых были: пол, возраст, ИМТ, НОМА-IR индекс, М-индекс, уровень глюкозы крови натощак, уровень гликированного гемоглобина.

В дальнейшем пациентов переводили в отделения бариатрической хирургии на базе многопрофильных клиник. В отделениях пациентам выполняли бариатрические операции, в ходе которых осуществляли забор подкожной жировой ткани из области подкожной жировой клетчатки живота, а также забор сальниковой жировой ткани из области большого сальника. Биоптаты жировой ткани в дальнейшем использовали для гистологического исследования и выделения МСК ЖТ.

1.2. Иммуногистохимическое исследование биоптатов жировой ткани пациентов.

Исследование проводили на срезах, приготовленных из замороженных гистохимических блоков биопсий, которые были получены в ходе бариатрических операций, с последующей фиксацией в ледяном ацетоне. Образцы обрабатывали первичными антителами к CD68, CCR7, CD206 с

последующим окрашиванием вторичными антителами, конъюгированными с красителями AlexaFluor488 и AlexaFluor594, ядерное окрашивание DAPI. Флуоресцентную микроскопию проводили на микроскопе Zeiss Axio Observer A1 (Zeiss, Германия). Среднюю площадь адипоцитов, процент инфильтрации жировой ткани общей популяцией макрофагов, а также содержание M1- и M2-макрофагов оценивали в программе ImageJ.

1.3. Выделение и адипогенная дифференцировка МСК ЖТ из жировой ткани пациентов.

Биоптаты подкожной и сальниковой жировых тканей очищали от сосудов и фрагментов соединительной ткани, измельчали до консистенции суспензии и проводили мягкое энзиматическое выделение МСК ЖТ с использованием коллагеназы I типа и диспазы, после чего культивировали МСК ЖТ при 37°C, 5% CO₂. Для дифференцировки в адипогенном направлении МСК ЖТ дорастивали до конфлюэнтности 90-100%, после чего в течение 2 дней культивировали клетки в присутствии 0.5 мМ дексаметазона, 0.25 мкМ изобутилметилксантина, 2 мкМ розиглитазона и 1 мкг/мл инсулина. Затем среду заменяли на DMEM HG + 10% FBS + 1 мкг/мл инсулина на 2 дня. Указанную схему смены сред использовали в течении 20 дней. На 21 день оценивали эффективность адипоцитарной дифференцировки с помощью окраски липофильным красителем OilRedO, а также с помощью ПЦР с обратной транскрипцией в реальном времени на маркеры адипоцитарной дифференцировки.

1.4. Оценка пролиферации МСК ЖТ пациентов.

Анализ FBS-индуцированной пролиферативной активности МСК подкожной жировой ткани проводили с помощью МТТ-теста, основанного на превращении 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-диметилтетразолийбромида в формазан, который солюбилизировали в изопропанол и измеряли оптическую плотность продукта при длине волны 595 нм на планшетном фотометре Multiscan Microplate Reader (Labsystems, США). Оценку распределения МСК ЖТ по фазам клеточного цикла выполняли с помощью набора реактивов Propidium Iodide Flow Cytometry Kit (Abcam, США).

1.5. Выделение фракции тотальной РНК и проведение количественной ПЦР в реальном времени.

Количественную ПЦР проводили для оценки экспрессии генов-маркеров адипоцитов (*GLUT4*, *PPAR γ* , *FABP4*) и для контроля наработки транскрипта (*IL-4*), а также гена *GAPDH*. Для выделения тотальной РНК из клеток использовали набор реактивов RNEasy Mini Kit (Qiagen, США). Для получения тотальной кДНК использовали набор реактивов RevertAid H

cDNA Synthesis Kit (ThermoScientific, США). Для проведения ПЦР в реальном времени использовали набор реактивов для ПЦР в реальном времени, краситель SYBR Green (Синтол, Россия). Реакцию проводили в автоматической ПЦР-системе StepOnePlus (AppliedBiosystems, США) в формате 96-луночного планшета с компьютерной регистрацией данных.

1.6. Культивирование и адипогенная дифференцировка преадипоцитов 3T3-L1.

Культуру преадипоцитов 3T3-L1 культивировали в стерильных условиях при 37°C, 5% CO₂ в среде DMEM HG с добавлением 2 mM L-глутамина, 100 ед/мл пенициллин/стрептомицина и 10% FBS. Адипогенную дифференцировку и ее оценку проводили аналогично пункту 1.3. в течение 14 дней.

1.7. Моделирование инсулиновой резистентности на зрелых адипоцитах 3T3-L1.

Моделирование ИР включало в себя несколько способов: индукция липид-зависимой ИР (с помощью конъюгатов БСА-пальмитиновой кислоты), индукция ИР с помощью факторов острого воспаления (бактериальный липополисахарид (ЛПС)), индукция ИР с помощью моделирования стресса ЭПР (брефелдин А), индукция ИР с помощью моделирования гипоксии (соли Co2+). Тест на чувствительность клеток к инсулину включал в себя оценку фосфорилирования основных участников инсулиновой сигнализации по их активирующим остаткам (pIRS1-Y612, pAkt-T308, pAkt-S473, pAS160-S318) методом иммуноблоттинга, а также оценку инсулин-индуцируемого захвата радиоактивных аналогов [³H]-2-дезоксиглюкозы.

1.8. Коррекция инсулиновой чувствительности адипоцитов 3T3-L1 с помощью рекомбинантного ИЛ-4.

Коррекцию инсулиновой чувствительности проводили путем обработки клеток в условиях липид-индуцируемой инсулиновой резистентности рекомбинантным ИЛ-4 (I1020, Sigma-Aldrich, США) в концентрациях 25, 50 и 100 нг/мл, с последующим тестом на чувствительность клеток к инсулину в условиях липид-индуцируемой ИР (п.1.7.).

1.9. Создание лентивирусной конструкции, кодирующей ИЛ-4.

Для создания лентивирусной конструкции, кодирующей ИЛ-4, проводили поиск последовательности для синтеза гена, кодирующего ИЛ-4 мыши. Последовательность гена выбирали по базе данных Nucleotide (NCBI Reference Sequence: NM_021283.2). Синтез необходимой последовательности заказали в компании «Евроген» (Россия) с последующей вставкой последовательности в коммерческую плазмиду LeGO-iG2 под промотор

SFFV (spleen focus forming virus). Для получения рекомбинантных лентивирусов клетки HEK293T котрансфицировали плазмидами pMDLg/pRRE, pRSV-Rev, pMD2.G (Addgene, США) и сконструированной плазмидой, несущей ген ИЛ-4. На следующий день после трансфекции на клетки наносили свежую среду; через 24 часа среду с вирусными частицами отбирали и центрифугировали. Супернатант с вирусом разделяли на аликвоты и хранили при -70°C до использования. Титр вируса определяли в компании «Евроген» (Россия), титр составил 4 вирусных частицы на клетку.

1.10. Лентивирусная трансдукция зрелых адипоцитов 3T3-L1 и контроль наработки трансгена.

Полученные рекомбинантные лентивирусы, несущие ген ИЛ-4 мыши, были использованы нами для получения модифицированных адипоцитов 3T3-L1. Трансдукцию проводили с использованием трансдуцирующего агента Polybrene (Invitrogen, США). Далее клетки инкубировали без смены среды не менее 24 ч., после чего проводили флуоресцентную микроскопию на микроскопе Zeiss Axio Observer A1 (Zeiss, Германия) для контроля трансдукции. Контроль наработки трансгена проводили методом ПЦР в реальном времени (пункт 1.5.), а также с помощью ИФА (Mouse IL-4 Quantikine ELISA, №M4000B). Экспрессию и секрецию ИЛ-4 определяли на 4 и 6 дни после совершения трансдукции.

1.11. Оценка инсулин-индуцируемого захвата радиоактивного аналога $[^3\text{H}]$ -2-дезоксиглюкозы.

Для оценки инсулин-индуцируемого захвата радиоактивных аналогов $[^3\text{H}]$ -2-дезоксиглюкозы зрелые адипоциты 3T3-L1 стимулировали инсулином, после чего добавляли раствор дезоксиглюкозы (100 мкМ 2-дезоксиглюкозы + 0.5 мкКи $[^3\text{H}]$ -2-дезоксиглюкозы). Для контроля неспецифического захвата глюкозы через инсулин-независимые транспортеры использовали цитохалазин В. Анализ захвата проводился путем растворения лизата образца в сцинтилляционной жидкости Beckman Ready-Solv HP (#158726, Beckman, США) и измерения количества распадов на миллиграмм белка в образце на счетчике RackBeta, LKB, Швеция. Из полученных результатов вычитали показатели счета в образцах с цитохалазином В, отсекая инсулин-независимый вход глюкозы.

1.12. Иммуноблоттинг.

Для проведения иммуноблоттинга клеточные лизаты разделяли с помощью электрофореза в денатурирующих условиях по методу Лэммли. Электроперенос белков выполняли на поливинилиденфторидные мембраны с последующей блокировкой в 5% растворе обезжиренного молока (Applichem,

Германия). Мембраны последовательно обрабатывали первичными и вторичными антителами, растворенными в 1% растворе обезжиренного молока на TBST, в разведениях согласно инструкциям производителя. Белковые полосы визуализировали с использованием хемилюминесцентного набора реактивов Clarity ECL (Bio-Rad, США) и гель-документирующей системы FusionX (Vilber Lourmat, Франция). Для количественной денситометрии использовали программу GelAnalyzer2010a.

1.13. Иммуноцитохимическое исследование ядерной транслокации транскрипционного фактора STAT6.

Для проведения исследования получали зрелые адипоциты 3T3-L1 на покровных стеклах после чего выполняли стимуляцию клеток рекомбинантным ИЛ-4 в концентрации 50 нг/мл в присутствии/отсутствии конъюгата БСА-пальмитиновая кислота. Затем проводили фиксацию в 4% растворе формальдегида с последующей пермеабиллизацией клеток 0.2% р-ром Triton X100 и кипящим раствором Antigen Unmasking Solution (Vector, США). Блокировку проводили 10% р-ром сыворотки донора вторичных антител, после чего окрашивали клетки первичными (anti-tSTAT6, #ab32520, Abcam, США) и вторичными антителами (конъюгат с красителем AlexaFluor594) согласно инструкции производителя. После этого проводили окрашивание ядерным красителем DAPI. Срезы заключали в AquaPolyMount (PolySciences, США). Препараты высушивали в темноте в течение двух дней, после чего проводили конфокальную микроскопию на микроскопе Zeiss LSM780 (Zeiss, Германия).

1.14. Статистический анализ.

Для статистического анализа полученных результатов использовали пакеты программ Microsoft Excel и Statistica8.0. Данные, полученные на клеточных линиях, представлены как среднее \pm стандартное отклонение. Для расчета достоверности различий использовали двухвыборочный Т-критерий с различной дисперсией выборок, принимая достоверными различия с вероятностью $p < 0.05$.

Данные, полученные на материале пациентов, представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего. Для расчета достоверности различий использовали двухвыборочный критерий Манна-Уитни, принимая достоверными различия с вероятностью $p < 0.05$.

2. ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Подкожная и сальниковая жировые ткани пациентов с СД2Т имеют в своем составе гипертрофированные адипоциты.

Биопсии подкожной и сальниковой жировой тканей были получены от пациентов с ожирением и наличием/отсутствием СД2Т, после чего оценивали среднюю площадь адипоцита в составе жировой ткани.

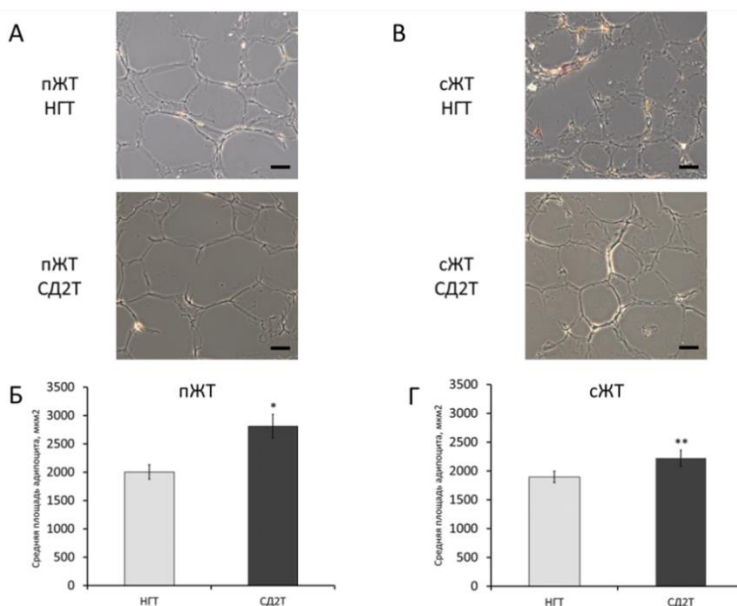


Рис.1. Средняя площадь адипоцита подкожной и сальниковой жировых тканей пациентов с НГТ и СД2Т. А – репрезентативная фотография адипоцитов подкожной жировой ткани, Б – гистограмма средней площади адипоцита подкожной жировой ткани, В – репрезентативная фотография адипоцитов сальниковой жировой ткани, Г – гистограмма средней площади адипоцита сальниковой жировой ткани. пЖТ – подкожная жировая ткань, сЖТ – сальниковая жировая ткань, НГТ – нормальная толерантность к глюкозе, СД2Т – сахарный диабет 2 типа. Данные на гистограммах представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего, критерий Манна-Уитни. * $p < 0.01$, ** $0.01 < p < 0.05$. Масштабный отрезок 20 мкм.

Средняя площадь адипоцита в составе подкожной жировой ткани пациентов с СД2Т была в 1.5 раза больше, чем в составе подкожной жировой ткани пациентов с нормальной глюкозной толерантностью (НГТ) (Рис.1 А-Б) ($2812 \text{ мкм}^2 \pm 209 \text{ мкм}^2$ для пациентов с СД2Т и $2003 \text{ мкм}^2 \pm 128 \text{ мкм}^2$ для пациентов с нормальной глюкозной толерантностью, * $p < 0.01$, критерий Манна-Уитни). Средняя площадь адипоцита в составе сальниковой жировой ткани пациентов с СД2Т была в 1.2 раза больше, чем в составе сальниковой

жировой ткани пациентов с нормальной глюкозной толерантностью (Рис.1. В-Г) ($2224 \text{ мкм}^2 \pm 142 \text{ мкм}^2$ для пациентов с СД2Т и $1897 \text{ мкм}^2 \pm 100 \text{ мкм}^2$, $^{**} 0.01 < p < 0.05$, критерий Манна-Уитни). Таким образом, адипоциты как в составе подкожной, так и в составе сальниковой жировых тканей гипертрофированы относительно адипоцитов в составе жировой ткани пациентов с нормальной глюкозной толерантностью. Это могло являться следствием сниженной пролиферативной активности МСК ЖТ пациентов с СД2Т, поэтому следующим этапом нашей работы была оценка пролиферативного статуса МСК ЖТ пациентов.

2.2.МСК подкожной и сальниковой жировых тканей пациентов с СД2Т имеют ухудшенную динамику пролиферативной активности по сравнению с МСК пациентов с НГТ.

Для анализа FBS-индуцированной пролиферативной активности МСК подкожной жировой ткани мы использовали МТТ-тест и анализ распределения по фазам клеточного цикла с использованием йодистого пропидия. В работе мы продемонстрировали, что МСК подкожной жировой ткани пациентов с СД2Т имеют ухудшенную кинетику пролиферации и число клеток было в 2, 2, 3 и 5 раз ниже на 24, 48, 72 и 96 часах наблюдения по сравнению с МСК подкожной жировой ткани пациентов с НГТ (Рис.2А). Более того, согласно данным анализа распределения по фазам клеточного цикла, обработка FBS МСК подкожной жировой ткани пациентов с СД2Т в течение 24 часов не повысила число клеток в G2/S фазе клеточного цикла (Рис.2В), что согласуется с данными МТТ-теста. В качестве контроля мы использовали МСК подкожной жировой ткани пациентов с НГТ, обработка их FBS продемонстрировала повышение числа клеток в G2/S фазе в 1.5 раза за 24 часа, что согласуется с данными МТТ-теста. Также в нашей работе мы продемонстрировали, что МСК сальниковой жировой ткани пациентов с СД2Т имеют ухудшенную кинетику пролиферации и число клеток было в 1.5 и 2 раза ниже на 72 и 96 часах наблюдения по сравнению с МСК сальниковой жировой ткани пациентов с НГТ (Рис.2Б). Согласно данным анализа распределения по фазам клеточного цикла, обработка FBS МСК сальниковой жировой ткани пациентов с СД2Т в течение 24 часов повысила число клеток в G2/S фазе клеточного цикла в 1.5 раза (Рис.2Г), что согласуется с данными МТТ-теста. В качестве контроля мы использовали МСК сальниковой жировой ткани пациентов с НГТ, обработка их FBS продемонстрировала повышение числа клеток в G2/S фазе в 1.5 раза за 24 часа, что согласуется с данными МТТ-теста. Тем не менее, статистически достоверных различий между активацией пролиферации за 24 часа МСК сальниковой жировой ткани пациентов с СД2Т и пациентов с НГТ не выявлено. Полученные результаты свидетельствуют о том, что нарушение пролиферации МСК ЖТ

может способствовать гипертрофии адипоцитов, а также нарушению формирования новых жировых депо. Гипертрофия адипоцитов является фактором риска развития гипоксии и скрытого воспаления жировой ткани, в том числе путем рекрутирования макрофагов и их поляризации в провоспалительный фенотип. Поэтому следующим этапом нашей работы была оценка степени воспаления жировой ткани

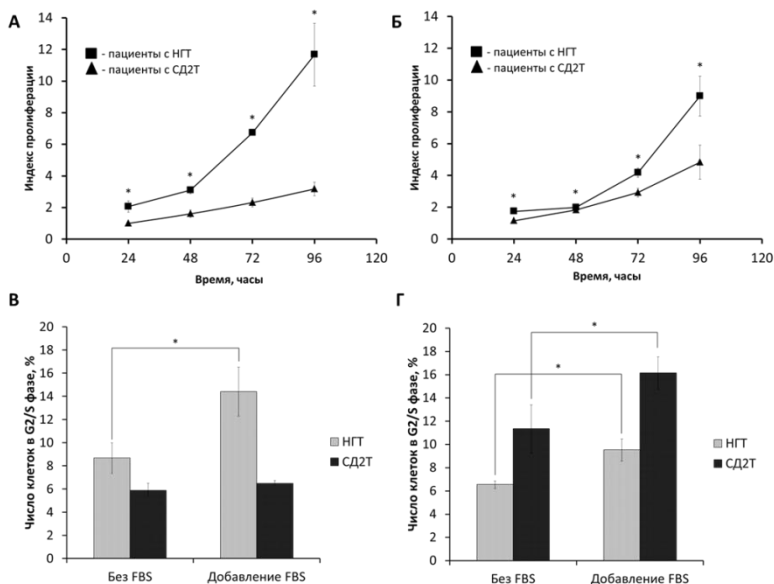


Рис.2. Пролиферативный потенциал МСК ЖТ пациентов с НГТ и СД2Т. А - зависимость пролиферативного индекса от времени для МСК подкожной жировой ткани, Б - зависимость пролиферативного индекса от времени для МСК сальниковой жировой ткани, В - число клеток в G2/S фазе до и после обработки МСК подкожной жировой ткани FBS, Г - число клеток в G2/S фазе до и после обработки МСК сальниковой жировой ткани FBS. НГТ – нормальная толерантность к глюкозе, СД2Т – сахарный диабет 2 типа.

2.3. Подкожная и сальниковая жировые ткани пациентов с ожирением и СД2Т имеют высокую степень инфильтрации CD68-позитивными клетками.

Гипертрофия адипоцитов может вести к активации воспалительного процесса в составе жировой ткани, поэтому мы оценивали степень инфильтрации подкожной и сальниковой жировых тканей CD68-позитивными клетками.

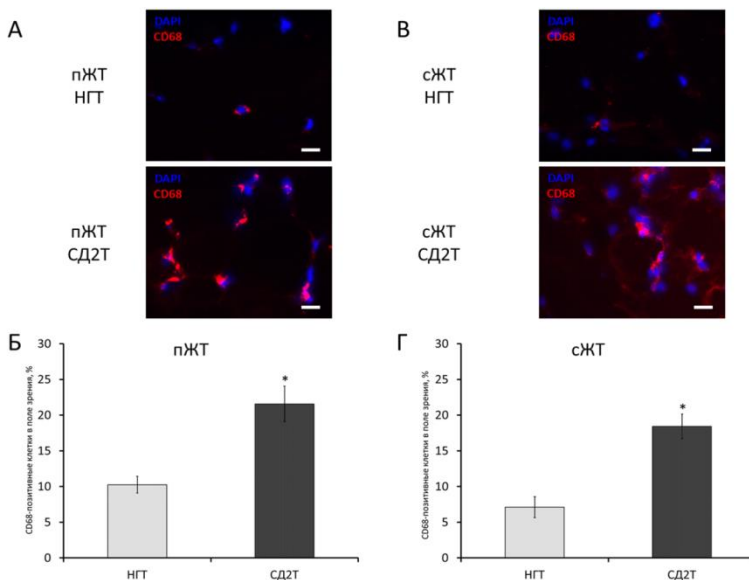


Рис.3. Инфильтрация CD68-позитивными клетками подкожной и сальниковой жировых тканей пациентов с СД2Т и НГТ. А – репрезентативная фотография инфильтрации CD68-позитивными клетками подкожной жировой ткани, Б – гистограмма степени инфильтрации подкожной жировой ткани CD68-позитивными клетками, В – репрезентативная фотография инфильтрации CD68-позитивными клетками сальниковой жировой ткани, Г – гистограмма степени инфильтрации сальниковой жировой ткани CD68-позитивными клетками. пЖТ – подкожная жировая ткань, сЖТ – сальниковая жировая ткань, НГТ – нормальная толерантность к глюкозе, СД2Т – сахарный диабет 2 типа. Данные на гистограммах представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего, критерий Манна-Уитни. * $p < 0.01$, ** $0.01 < p < 0.05$. Масштабный отрезок 40 мкм.

Пациенты с СД2Т имеют в 2 раза большую инфильтрацию подкожной жировой ткани CD68-позитивными клетками по сравнению с пациентами с НГТ (Рис.3. А-Б) ($21.6\% \pm 2.5\%$ CD68-позитивных клеток в поле зрения у пациентов с СД2Т против $10.3\% \pm 1.2\%$ CD68-позитивных клеток в поле зрения у пациентов с НГТ, * $p < 0.01$, критерий Манна-Уитни). Также пациенты с СД2Т имеют в 2.6 раза более высокую инфильтрацию CD68-позитивными клетками сальниковой жировой ткани по сравнению с пациентами с НГТ (Рис.3. В-Г) ($18.4\% \pm 1.8\%$ CD68-позитивных клеток в

поле зрения у пациентов с СД2Т против $7.1\% \pm 1.5\%$ CD68-позитивных клеток в поле зрения у пациентов с НГТ, * $p < 0.01$, критерий Манна-Уитни). Таким образом, подкожная и сальниковая жировые ткани обладают высоким уровнем воспаления, которое может оказывать негативное влияние на адипогенную дифференцировку МСК ЖТ.

2.4. МСК ЖТ пациентов с СД2Т имеют пониженную способность к адипогенной дифференцировке, по сравнению с МСК ЖТ пациентов с НГТ.

Помимо оценки пролиферативной активности выделенных МСК ЖТ, нами была проведена оценка способности выделенных МСК ЖТ к адипоцитарной дифференцировке с использованием качественной (окраска липофильным красителем OilRedO) и количественной (измерение экспрессии мРНК генов-маркеров адипогенеза методом ПЦР в реальном времени) оценок.

Анализируя липидный состав полученных адипоцитов, можно отметить, что МСК сальниковой и подкожной жировых тканей больных с ожирением и наличием/отсутствием СД2Т не способны к спонтанной дифференцировке в адипоциты при культивировании в стандартных условиях (DMEM HG + 10% FBS), а также способны дифференцироваться в зрелые адипоциты при культивировании их в среде с индукторами адипогенеза (дексаметазон, розиглитазон, изобутилметилксантин, инсулин). Оценивая морфологию полученных адипоцитов, видно, что МСК сальниковой жировой ткани дифференцируются несколько хуже, нежели МСК подкожной жировой ткани. Обращаясь к морфологии жировых капель в полученных адипоцитах можно отметить, что адипоциты, полученные из МСК сальниковой и подкожной жировых тканей пациентов с НГТ, накапливают жировые капли в меньшем количестве, а также меньшего размера. Адипоциты, полученные из МСК сальниковой и подкожной жировых тканей пациентов с СД2Т, имеют более крупные адипоциты со значительно большим количеством жировых капель. Таким образом, можно предположить, что в адипогенной дифференцировке *in vitro* МСК сальниковой и подкожной жировых тканей пациентов с СД2Т склонны к формированию адипоцитов «гипертрофического» типа, которые отличаются большими размерами и большим количеством накопленных жировых капель, в то время как МСК сальниковой и подкожной жировых тканей пациентов с НГТ склонны к формированию адипоцитов «гиперпластического» типа, которые отличаются меньшими размерами и небольшим количеством жировых капель.

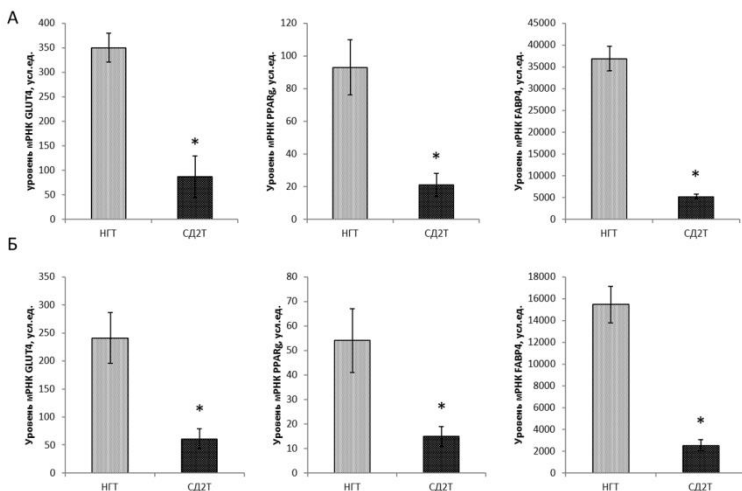


Рис.4. Экспрессия генов-маркеров адипогенеза на 21 день адипогенной дифференцировки. А – экспрессия адипогенных маркеров *GLUT4*, *PPARgamma* и *FABP4* в адипоцитах, полученных из МСК подкожной жировой ткани пациентов, Б – экспрессия адипогенных маркеров *GLUT4*, *PPARgamma* и *FABP4* в адипоцитах, полученных из МСК сальниковой жировой ткани пациентов. НГТ – нормальная толерантность к глюкозе, СД2Т – сахарный диабет 2 типа. Данные представлены в формате среднее значение \pm стандартная ошибка среднего, * $p < 0.01$, критерий Манна-Уитни.

На Рис.4. представлены результаты измерения экспрессии генов-маркеров адипогенной дифференцировки в МСК ЖТ в исследуемой группе. Анализируя результаты количественного анализа экспрессии генов-маркеров адипогенной дифференцировки стоит отметить, что все МСК подкожной жировой ткани действительно способны к адипогенной дифференцировке (минимальный рост экспрессии гена-маркера составил рост экспрессии *PPARgamma* в 20 раз для МСК ЖТ пациентов с СД2Т). Тем не менее, для всех исследованных генов-маркеров адипогенной дифференцировки (*GLUT4*, *PPARgamma*, *FABP4*) наблюдается сниженная экспрессия в МСК ЖТ пациентов с СД2Т. Экспрессия маркера снижена в МСК ЖТ пациентов с СД2Т по сравнению с НГТ в 4.3, 4.8 и 9 раз для *GLUT4*, *PPARgamma* и *FABP4* соответственно.

Суммируя данные по морфологии дифференцированных адипоцитов, а также экспрессии генов-маркеров адипогенеза, можно отметить, что МСК ЖТ пациентов с СД2Т формируют адипоциты «гипертрофического типа» со

сниженной экспрессией генов-маркеров адипогенеза (показано только для МСК подкожной жировой ткани), в то время как МСК ЖТ пациентов с НГТ формируют адипоциты «гиперпластического» типа.

2.5.Обработка инсулинорезистентных зрелых адипоцитов 3T3-L1 рекомбинантным ИЛ-4 в концентрации 50 нг/мл восстанавливает инсулиновую чувствительность зрелых адипоцитов.

В качестве молекулы-кандидата для восстановления инсулиновой сигнализации адипоцитов нами был выбран противовоспалительный цитокин ИЛ-4. В нашей работе мы стимулировали нарушение инсулиновой сигнализации в зрелых адипоцитах с помощью суточной инкубации клеток с конъюгатом БСА-ПК, также на эти же сутки к клеткам добавляли рекомбинантный ИЛ-4 (каталожный номер I1020, фирма Sigma Aldrich) в концентрациях 25 нг/мл, 50 нг/мл и 100 нг/мл. Далее клетки лизировали и анализировали инсулиновую сигнализацию методом иммуноблоттинга.

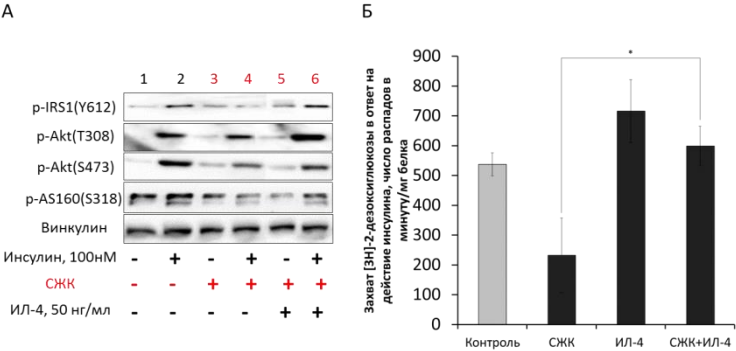


Рис.5. ИЛ-4 в концентрации 50 нг/мл восстанавливает инсулиновую чувствительность адипоцитов 3T3-L1 в ответ на действие инсулина даже в присутствии свободных жирных кислот. А – репрезентативные иммуноблоттинги, Б – инсулин-индуцируемый захват ³H]-2-дезоксиглюкозы. СЖК – свободные жирные кислоты. * p<0.01, критерий Стьюдента.

Анализ активационного фосфорилирования участников инсулиновой сигнализации (pIRS1-Y612, pAkt-T308, pAkt-S473, pAS160-S318) показал, добавление свободных жирных кислот к культуре дифференцированных адипоцитов 3T3-L1 приводит к снижению активационного фосфорилирования основных участников инсулиновой сигнализации в 1.5-2 раза. Добавление в данную систему ИЛ-4 в концентрации 50 нг/мл вызывает восстановление активирующего фосфорилирования основных участников

инсулиновой сигнализации до уровня контроля (Рис.5А). Концентрации 25 нг/мл и 100 нг/мл оказывают меньшее влияние на восстановление инсулиновой сигнализации в модели липид-индуцируемой инсулиновой резистентности. Кроме того, в ходе нашей работы было продемонстрировано, что ИЛ-4 не только улучшает инсулиновую сигнализацию в составе зрелых адипоцитов 3Т3-L1, но и полностью восстанавливает способность адипоцитов к инсулин-индуцируемому захвату глюкозы (Рис.5Б). Добавление свободных жирных кислот в 2 раза снижает способность зрелых адипоцитов к инсулин-индуцируемому захвату глюкозы, в то время как добавление ИЛ-4 восстанавливает эту способность до уровня контроля.

2.6. Трансдукция зрелых адипоцитов 3Т3-L1 защищает зрелые адипоциты 3Т3-L1 от формирования липид-индуцированной инсулиновой резистентности.

На следующем этапе нашей работы мы оценивали восприимчивость линейных адипоцитов 3Т3-L1 к формированию инсулиновой резистентности в липид-индуцируемой модели.

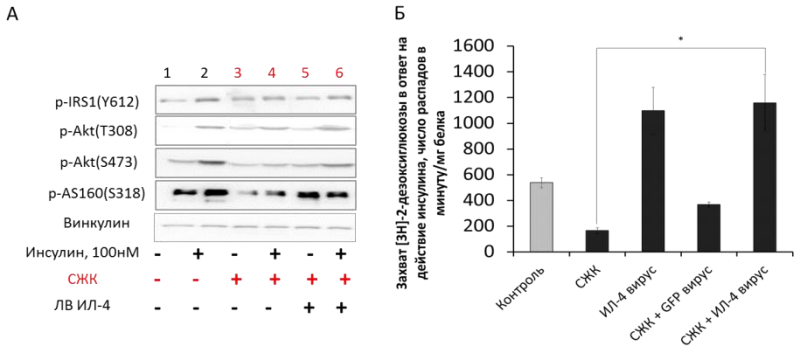


Рис.6. Лентивирусная трансдукция геном ИЛ-4 делает зрелые адипоциты 3Т3-L1 невосприимчивыми к действию СЖК на снижение инсулиновой чувствительности. А – репрезентативные иммуноблоттинги, Б – инсулин-индуцируемый захват [³H]-2-дезоксиглюкозы. СЖК – свободные жирные кислоты. * $p < 0.01$, критерий Стьюдента.

Нами проведена оценка состояния инсулиновой сигнализации в адипоцитах, гиперэкспрессирующих ИЛ-4. В нашем эксперименте добавление инсулина к необработанным клеткам вызывает значительный подъем фосфорилирования исследуемых участников инсулиновой сигнализации. Добавление свободных жирных кислот значительно снижает активацию по всем исследованным

участникам инсулиновой сигнализации. Клетки, гиперэкспрессирующие ИЛ-4, при добавлении свободных жирных кислот несколько увеличивают инсулин-индуцируемое фосфорилирование IRS-1, оставляют неизменным инсулин-зависимое фосфорилирование pAkt-Thr308 и pAkt-S473, а также фосфорилирование pAS160-S318. Однако, оценивая репрезентативный иммуноблоттинг и абсолютные значения оптической плотности каждой полосы, нормированной на винкулин, можно отметить, что фосфорилирование pIRS-Y612, pAkt-T308 и pAkt-S473, стимулированное инсулином, в клетках с гиперэкспрессией ИЛ-4 остается таким же, как и в контрольных клетках без добавления свободных жирных кислот (Рис.6А).

Помимо анализа инсулиновой сигнализации, в ходе нашей работы был проведен анализ способности адипоцитов, гиперэкспрессирующих ИЛ-4, к инсулин-индуцируемому захвату глюкозы. Результаты продемонстрировали, что адипоциты, гиперэкспрессирующие ИЛ-4, не снижают уровень инсулин-зависимого поглощения глюкозы в модели ИР по сравнению с контрольными клетками (Рис.6Б). Полученные результаты свидетельствуют о том, что стабильная экспрессия ИЛ-4 зрелыми адипоцитами 3T3-L1 может защищать их от снижения инсулиновой чувствительности в условиях липид-индуцируемой ИР.

2.7.Обработка зрелых адипоцитов ИЛ-4 в условиях липид-индуцированной инсулиновой резистентности стимулирует транслокацию транскрипционного фактора STAT6 в ядро, а также активацию фосфорилирований IRS и Akt.

Для понимания механизма действия ИЛ-4 на восстановление инсулиновой чувствительности зрелых адипоцитов мы провели анализ классической сигнализации, индуцируемой ИЛ-4 в иммунных клетках – активация STAT6 сигнального каскада. Для зрелых адипоцитов активация STAT6 под действием ИЛ-4 ранее не продемонстрирована в литературе.

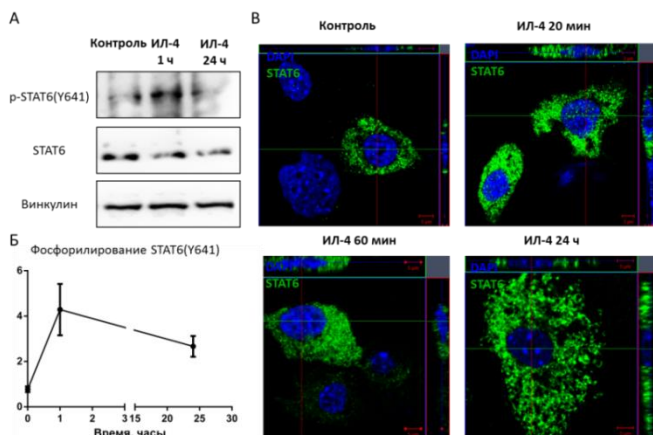


Рис.7. ИЛ-4 стимулирует активацию и транслокацию транскрипционного фактора STAT6 в ядро зрелых адипоцитов при наличии/отсутствии СЖК. А – репрезентативный иммуноблоттинг окраски лизатов клеток на pSTAT6-Y641; Б – денситометрия иммуноблоттингов окрашивания лизатов клеток на pSTAT-Y641; В – панель репрезентативных фотографий ядерной транслокации STAT6 под действием ИЛ-4 (50 нг/мл), конфокальная микроскопия.

Анализ активирующего фосфорилирования STAT6 под действием ИЛ-4 в лизатах зрелых адипоцитов 3T3-L1 показал, что под действием ИЛ-4 в зрелых адипоцитах происходит активирующее фосфорилирование, причем степень фосфорилирования на ранних этапах не зависит от концентрации ИЛ-4 в исследованном диапазоне (Рис.7А-Б). Помимо этого, конфокальной микроскопией продемонстрирована транслокация STAT6 в ядро адипоцитов под действием ИЛ-4. В случае контрольных клеток, мы видим, что обработка ИЛ-4 в концентрации 50 нг/мл в течение 20 минут вызывает транслокацию STAT6 в ядро (Рис7В, верхняя панель), в то время как на времени инкубации 1 час количество STAT6 в ядре очень невелико.

Однако, в работе анализировали не только классический STAT6-зависимый сигнальный каскад, но и активность инсулинового сигнального каскада под действием ИЛ-4. Было показано, что под действием ИЛ-4 на зрелые адипоциты происходит быстрая активация фосфорилирований pIRS-Y612 и pAkt-S473 (1 час), которая исчезает к 24 часам. Фосфорилирования pAkt-T308 и pAS160-S318 не изменялись. Полученные результаты указывают на то, что ИЛ-4 кратковременно запускает некоторые триггерные сигнальные

каскады, а долгосрочное действие ИЛ-4 на инсулиновую чувствительность адипоцитов сопряжено с экспрессионными эффектами

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в данной работе продемонстрирована важнейшая роль воспаления в развитии ИР и СД2Т жировой ткани. По нашей гипотезе, развитие воспаления жировой ткани и ИР сопряжено с нарушением пролиферативного и дифференцировочного потенциала прогениторных клеток жировой ткани. Показано, что для коррекции ИР возможно использовать противовоспалительный цитокин ИЛ-4 как в виде рекомбинантного белка, так и в виде генно-инженерной конструкции. Механизм действия ИЛ-4 на зрелые адипоциты сопряжен с фосфорилированием транскрипционного фактора STAT6, а также его ядерной транслокацией.

ВЫВОДЫ

1. Подкожная и сальниковая жировые ткани пациентов с ожирением и СД2Т имеют в своем составе гипертрофированные адипоциты. МСК ЖТ пациентов с ожирением и СД2Т характеризуются сниженными пролиферативным потенциалом и способностью к адипогенной дифференцировке.
2. При ожирении и СД2Т адипоциты, полученные из МСК ЖТ, подкожной и сальниковой жировой ткани имеют повышенную активность стресс-активируемой киназы JNK. Жировая ткань пациентов с ожирением и СД2Т имеет более высокую инфильтрацию макрофагами, склонными к провоспалительному фенотипу.
3. В культуре зрелых адипоцитов 3T3-L1 агенты, индуцирующие метаболический стресс, ухудшают инсулиновую чувствительность. Эти эффекты сопровождаются зависимой от времени активацией стресс-активируемой киназы JNK1/2.
4. Противовоспалительный цитокин ИЛ-4 восстанавливает инсулиновую чувствительность адипоцитов в условиях липид-индуцированной ИР, не влияя на эффективность адипогенной дифференцировки.
5. Зрелые адипоциты 3T3-L1, модифицированные с помощью гена ИЛ-4, защищены от развития липид-индуцируемой ИР.
6. Действие ИЛ-4 на зрелые адипоциты 3T3-L1 сопровождается активацией фосфорилирования транскрипционного фактора STAT6 с последующей ядерной транслокацией, а также фосфорилирований pIRS1-Y612 и pAkt-S473.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах:

1. Стафеев Ю.С., Меньшиков М.Ю., Цоколаева З.И., Шестакова М.В., Парфёнова Е.В. Молекулярные механизмы возникновения латентного воспаления при метаболическом синдроме. Возможная роль сиртуинов и рецепторов активации пролиферации пероксисом гамма. // Биохимия. - 2015. - Т. 80, № 10. – С. 1480-1492.
2. Stafeev I.S., Vorotnikov A.V., Ratner E.I., Menshikov M.Y., Parfyonova Ye.V. Latent inflammation and insulin resistance in adipose tissue. // Int. J. Endocrinol. – 2017. – V. 2017. – номер статьи 5076732.
3. Стафеев Ю.С., Мичурина С.С., Зубкова Е.С., Белоглазова ИЮБЮЮ Ратнер Е.И., Парфёнова Е.В., Меньшиков М.Ю. Модуляция воспалительного статуса макрофагов и их паракринного воздействия на чувствительность адипоцитов к инсулину с помощью активаторов сиртуинов и рецепторов PPARgamma. // Бюлл. Эксп. Биол. Мед. – 2018. – Т. 165, № 4. – С. 415-420.
4. Стафеев Ю.С., Мичурина С.С., Подкуйченко Н.В., Воротников А.В., Меньшиков М.Ю., Парфёнова Е.В. Интерлейкин-4 восстанавливает чувствительность к инсулину в адипоцитарной модели липид-индуцируемой инсулиновой резистентности. // Биохимия. – 2018. – Т. 83, № 10. – С. 662-672.
5. Stafeev I., Podkuychenko N., Michurina S., Sklyanik I., Panevina A., Shestakova E., Yah'yaev K., Fedenko V., Ratner E., Vorotnikov A., Menshikov M., Yashkov Y., Parfyonova Ye., Shestakova M. Low proliferative potential of adipose-derived stromal cells associates with hypertrophy and inflammation in subcutaneous and omental adipose tissue of patients with type 2 diabetes mellitus. // J. Diabetes. Complications. – 2019. – Т. 33, № 2. – С. 148-159.

Тезисы докладов:

6. Zubkova E., Stafeev I., Beloglazova I., Makarevich P., Menshikov M., Parfyonova Ye. The role of inflammatory microenvironment in adipose tissue mesenchymal stem cell stress response-induced activity. // Abstract Book of XV Annual Meeting of International Society of Stem Cell Research. – Stockholm. - 2015. – P. 175.
7. Stafeev I.S., Vorotnikov A.V., Palkina K.A., Parfyonova Ye.V., Menshikov M.Y. M1 and M2 polarized macrophages divergently affect insulin-dependent Akt phosphorylation. // Abstract Book of FASEB Conference “Nutritional Immunology: The Role in Health and Diseases”. – Lisbon. – 2015. – P. 62.
8. Stafeev I.S., Vorotnikov A.V., Tsokolayeva Z.I., Parfyonova Ye.V., Menshikov M.Y. Free fatty acids and hydrogen peroxide cause insulin resistance but increase phosphorylation of Akt. // Abstract Book of conference “Diabetes: New insights in molecular mechanisms and therapeutic strategies”. – Kyoto. – 2015. – P. 87.

- 9.Stafeev I., Vorotnikov A., Yunusova V., Menshikov M., Parfyonova Ye. Specific SIRT1 activation in polarized macrophages improves insulin-dependent Akt phosphorylation in adipocytes in vitro. // *Cytokine*. – 2016. – V. 87. – P. 137.
- 10.Stafeev I., Vorotnikov A., Menshikov M., Parfyonova Ye. Polarized macrophages can regulate Akt phosphorylation and insulin resistance in 3T3L1 adipocytes. // *Eur.Heart.J.* – 2016. – V. 37, S. 1. – P. 737-738.
- 11.Podkuychenko N.V., Stafeev I.S., Vorotnikov A.V., Menshikov M.Y. Exploring mechanisms of insulin resistance in preadipocytes. // *Abstract Book of International Symposium “Biological Motility 2016”*. – Puschino. – 2016. – P. 185-186.
- 12.Стафеев Ю.С., Юнусова В.А., Меньшиков М.Ю., Парфёнова Е.В. Сиртуин 1 типа и PPAR гамма как перспективные мишени регуляции воспалительного потенциала макрофагов. // *Сборник тезисов конференции «Биомедицина 2016»*. – Новосибирск. – 2016. – С. 91-92.
- 13.Меньшиков М.Ю., Стафеев Ю.С. Фармакологическая модуляция воспалительного статуса макрофагов и их паракринного воздействия на чувствительность адипоцитов к инсулину. // *Гены и клетки*. – 2017. – Т. 12. – С. 161-162.
- 14.Стафеев Ю.С., Мичурина С.С., Воротников А.В., Меньшиков М.Ю., Парфёнова Е.В. ИЛ-4 восстанавливает активацию инсулиновой сигнализации в адипоцитах 3T3-L1 без влияния на адипогенную дифференцировку. // *Гены и клетки*. – 2017. – Т. 12. – С. 233.
- 15.Воротников А.В., Подкуйченко Н.В., Стафеев Ю.С., Меньшиков М.Ю. Молекулярный механизм развития резистентности к инсулину в адипоцитах: ре-активация рапамицином. // *Цитология*. – 2017. – Т. 59. – С. 752-753.
- 16.Стафеев Ю.С., Мичурина С.С., Воротников А.В., Меньшиков М.Ю., Парфёнова Е.В. Изменение активности инсулинового сигнального каскада при химической индукции инсулинорезистентности в адипоцитах 3T3-L1. // *Сборник тезисов Российского Национального Конгресса Кардиологов 2017*. – Санкт-Петербург. – 2017. – С. 263.
- 17.Стафеев Ю.С., Мичурина С.С., Воротников А.В., Меньшиков М.Ю., Парфёнова Е.В. Интерлейкин-4 восстанавливает активность инсулинового сигнального каскада в модели липид-индуцируемой инсулинорезистентности. // *Сборник тезисов Российского Национального Конгресса Кардиологов 2017*. – Санкт-Петербург. – 2017. – С. 181.
- 18.Stafeev I.S., Michurina S.S., Vorotnikov A.V., Menshikov M.Y., Parfyonova Ye.V. IL-4 recovers insulin signaling activity in FFA-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. // *Cytokine*. – 2017. – V. 100. – P. 102.
- 19.Stafeev I.S., Vorotnikov A.V., Menshikov M.Y., Parfyonova Ye.V. M1 and M2 polarized macrophages divergently affect insulin-dependent Akt phosphorylation.

// Abstract Book of conference “Macrophage biology at the single-cell era”. – Gent. – 2017. – P. 36.

20.Стафеев Ю.С., Мичурина С.С., Подкуйченко Н.В., Скляник И.А., Попкова А.С., Шестакова Е.А., Яхьяев К.А., Феденко В.В., Воротников А.В., Меньшиков М.Ю., Яшков Ю.И., Шестакова М.В., Парфёнова Е.В. Роль воспалительного фона жировой ткани в развитии сахарного диабета у пациентов с морбидным ожирением. // Сборник тезисов Российского Национального Конгресса Кардиологов 2018. – Москва. – 2018. – С. 470.

21.Stafeev I., Michurina S., Podkuychenko N., Sklyanik I., Panevina A., Shestakova E., Yah'yaev K., Ratner I., Vorotnikov A., Menshikov M., Yashkov Y., Shestakova M., Parfyonova Ye. Adipose-derived stromal cells of patients with type 2 diabetes mellitus have higher level of autophagy and inflammation compare with normal glucose tolerance patients. // Abstract Book of 26th Conference of the European Cell Death Organization “Cell death in disease: from small molecules to translational medicine”. – Saint-Petersburg. – 2018. – P. 80.

22.Michurina S., Stafeev I., Beloglazova I., Molokotina Y., Shevchenko E., Vorotnikov A., Menshikov M., Parfyonova Ye. Lentiviral transfer of interleukin 4 gene to 3T3-L1 adipocytes prevents development of lipid-induced insulin resistance. // Eur.Heart.J. – 2018. – V. 39, S. 1. – P. 492.

23.Stafeev I., Michurina S., Podkuychenko N., Sklyanik I., Panevina A., Shestakova E., Yah'yaev K., Ratner I., Vorotnikov A., Menshikov Y., Yashkov Y., Shestakova M., Parfyonova Ye. ADSC of metabolically healthy vs type 2 diabetes mellitus obese patients: inflammation, proliferative status, cell cycle distribution and adipogenic differentiation. // Abstract Book of XVIII Annual Meeting of International Society of Stem Cell Research. – Melbourne. - 2018. – P. 492.

24.Stafeev I., Michurina S., Beloglazova I., Molokotina Y., Shevchenko E., Vorotnikov A., Menshikov M., Parfyonova Ye. IL-4 gene lentiviral transduction to mature adipocytes has positive long-term effects on their insulin sensitivity, but these effects are not mediated by STAT6. // Endocr.Practice. – 2019. – V. 25. – P. 8A.