

ФЕНИЛМАСЛЯНАЯ КИСЛОТА УСИЛИВАЕТ ПОТРЕБЛЕНИЕ ГЛЮКОЗЫ АДИПОЦИТАМИ 3T3-L1

© Х. Фахури,¹ С. Осман,¹ Н. Газале,² Н. Дахда,¹ М. Эль-Сибай,² А. Канаан^{1, *}

¹ Кафедра биомедицинских наук факультета медицины и медицинских наук
Баламандского университета, Эль-Кура, Ливан,
и ² Департамент естественных наук, Школа искусств и наук
Ливанского американского университета, Бейрут, Ливан;
* электронный адрес: amjad.kanaan@balamand.edu.lb

Сахарный диабет — хроническое метаболическое заболевание, связанное с нарушением усвоения глюкозы вследствие резистентности к инсулину. Фосфатаза PTEN является ингибитором инсулинзависимого PI3K-сигнального пути, активирующего глюкозный транспортер (GLUT) 4-го типа (GLUT-4). В настоящей работе оценивали влияние фенолмасляной кислоты (ФМК), химического шаперона и потенциального модулятора активности PTEN, на уровень потребления глюкозы дифференцированными адипоцитами 3T3-L1. Дифференциацию преадипоцитов 3T3-L1 в зрелые адипоциты характеризовали по накоплению липидных включений и экспрессии AP2. Все показатели оценивали как при нормальном уровне потребления глюкозы, так и после стимуляции клеток инсулином. Для оценки уровня GLUT-1, GLUT-4, PIP3, pAkt, pPTEN и PARK-7 использовали Вестерн-блот-анализ и иммуноцитохимический метод. Секретию лептина и адипонектина характеризовали с помощью иммуноферментного метода. Показано, что обработка ФМК независимо от инсулина значительно увеличивает потребление глюкозы 3T3-L1 адипоцитами. В клетках при этом общее количество GLUT-1 и доля GLUT-4, транслоцированного в плазматическую мембрану, возрастают, хотя общее количество GLUT4 не меняется. Кроме того, увеличивается количество PIP3 и pAkt, что свидетельствует об усилении активности PI3K-сигнального пути и увеличении количества фосфорилированной формы PTEN, что в свою очередь говорит о снижении активности этого белка. Уровень PARK-7 в клетках после действия ФМК также возрастал. Обработка зрелых адипоцитов ФМК не влияла на их дифференцировку, но снижала соотношение лептина к адипонектину в среде культивирования. Таким образом, в настоящей работе показано, что ФМК усиливает усвоение глюкозы адипоцитами, меняя, вероятнее всего, уровень экспрессии глюкозных транспортеров и (или) участников PI3K-сигнального каскада. Полученные данные позволяют рассматривать ФМК как перспективный препарат для применения в комплексной противодиабетической терапии.

Ключевые слова: диабет II типа, адипоциты, фенолмасляная кислота, PARK-7.

Принятые сокращения: АМФК — аденозинмонофосфатзависимая протеинкиназа, ФМК — фенолмасляная кислота, GLUT — инсулинзависимый транспортер глюкозы, PI3K — фосфоинозитид-3-киназа.

Сахарный диабет — хроническое прогрессирующее нарушение метаболизма, число больных которым в последние десятилетия постоянно увеличивается (Wild et al., 2004). Гипергликемия, наиболее значимый симптом данного заболевания, развивается вследствие функционального дефицита инсулина или устойчивости к нему, иногда при сочетании этих факторов (Deshpande et al., 2008). Диабет II типа (большинство его форм) является комплексным заболеванием: сочетание генетических изменений, обуславливающих предрасположенность к нему, и неблагоприятных внешних факторов способствует формированию резистентности к инсулину и недостаточной выработке инсулина (Cornell, 2015). Нарушения в системе секреции инсулина связывают с постепенным развитием дисфункции бета-клеток и инициацией апоптоза, вызываемыми липотоксичностью, глюкотоксичностью и накоплением отложений амилина (Carrera Bo-

da, Martinez-Moreno, 2013). Инсулин влияет на многие биологические процессы во многих тканях, в частности жировой (Dimitriadis et al., 2011). Последняя играет ключевую роль в поддержании глюкозного обмена организма, секретирова цитокиноподобные белки, называемые адипокинами (Carrera Boada, Martinez-Moreno, 2013). Связь адипокинов, в частности адипонектина и лептина, с резистентностью к инсулину подтверждена достаточно давно: адипонектин усиливает чувствительность к глюкозе, а лептин наряду с некоторыми другими цитокинами, наоборот, увеличивает инсулинорезистентность (Savage et al., 2005).

Инсулинорезистентность приводит к нарушениям доставки глюкозы к тканям и органам (Gould, Holman, 1993). В норме глюкозный обмен включает в себя перемещение глюкозного транспортера (GLUT) 4-го типа (GLUT-4) из цитоплазматических везикул к плазматиче-

ской мембране (Dimitriadis et al., 2011). Начальный этап поглощения глюкозы адипоцитами связан с транспортом 1-го типа GLUT-1 (Wild et al., 2004), локализованным преимущественно на плазматической мембране (Gould, Holman, 1993). В процессе дифференциации количество GLUT-1 снижается (Hauner et al., 1998). Многие факторы влияют на уровень GLUT-1 в плазматической мембране, увеличивая транскрипционную активность, либо модулируя доставку GLUT-1, либо делают сразу то и другое (Nugent et al., 2001; Perrini et al., 2004; Roach, Plomann, 2007; Shang et al., 2008; Ge et al., 2011).

Процесс инсулининдуцированной транслокации GLUT-4 стимулируется сигнальным путем через протеинкиназы PI3K/Akt (протеинкиназа B) (Taniguchi et al., 2006). Фосфатаза и гомолог тензина PTEN дефосфорилирует фосфатидилинозитол-3-фосфат (PIP3), осуществляя негативную регуляцию сигнального пути PI3K и влияя таким образом на метаболическую активность инсулина, включая поглощение глюкозы (Kim et al., 2005). Негативная регуляция активности PTEN осуществляется широко распространенным многофункциональным белком-7 болезни Паркинсона (PARK-7, дегликаза DJ-1) (Chu, Tarnawski, 2004; Kim et al., 2005; Da Costa, 2007; Kim et al., 2009), который необходим для адипогенеза и участвует в развитии инсулиновой резистентности (Jain et al., 2012; Kim et al., 2014).

В ряде работ показано, что экспрессия гена *PARK-7* резко возрастает при действии фенилмасляной кислоты (ФМК), и это увеличение существенно для эффекта ФМК (Zhou et al., 2011). ФМК — ароматическая замещенная жирная кислота с короткими цепочками, которая действует как ингибитор деацетилаз гистонов и как химический шаперон (Iannitti et al., 2011). Возможная роль жирных кислот с короткими цепочками, включая ФМК, в патогенезе диабета и развитии инсулинорезистентности в настоящее время до конца не изучена. Введение бутирата усиливает инсулиновый сигнал и снимает некоторые последствия инсулинорезистентности, вызванной диетой, у мышей (Gao et al., 2009). ФМК восстанавливает нормальный уровень глюкозы в сыворотке крови у дефицитных по лептину мышей с диабетом (Ozcan et al., 2006; Xu et al., 2010). В дифференцированных миобластах мышей после добавления ФМК возрастает уровень мРНК *GLUT4*, хотя базовое потребление глюкозы клетками не увеличивается (Hu et al., 2014). Мы предположили, что ФМК может модулировать канонический инсулиновый сигнальный путь и приводить к увеличению потребления глюкозы культивируемыми адипоцитами.

Материал и методика

Культивирование и дифференцировка. Работа выполнена на клеточной линии 3T3-L1 ATCC®CL-173™ (пассажи с 3-го по 7-й). Фибробласты 3T3-L1 культивировали во флаконах 25 см² при 37 °C в атмосфере 5 % CO₂ в среде DMEM, содержащей 10 % сыворотки крупного рогатого скота (Sigma-Aldrich), пенициллин (50 ед./мл) и стрептомицин (50 мкг/мл, Sigma-Aldrich). Среду заменяли каждые 2—3 сут до достижения 70 % конfluence, после чего клетки переносили во флаконы 75 см² и культивировали дальше. Для ряда экспериментов клетки переносили в 6-луночные планшеты (8·10⁴ кл./ячейка) для культивирования (BD Falcon, США). Перед посевом клетки считали с помощью гемо-

цитометра, жизнеспособность оценивали в 0.4%-ном растворе трипанового синего.

В планшетах клетки инкубировали до достижения 100%-ной конfluence, затем оставляли в среде еще на 48 ч, после чего заменяли DMEM на среду для дифференцировки, которая представляла собой DMEM, содержащую 10 % сыворотки крупного рогатого скота, 1 мкМ дексаметазона, 0.5 мМ изобутилметилксантина и 1 мкг/мл инсулина. Клетки инкубировали 48 ч, затем среду заменяли на среду для поддержания адипоцитов (90 % DMEM, 10 % сыворотки крупного рогатого скота и 1 мкг/мл инсулина) и меняли ее каждые 2 сут. Общая продолжительность культивирования составляла 14 сут, после чего в культуре наблюдали морфологический признак зрелости адипоцитов — накопление липидных включений.

Дифференцированные клетки делили на 4 экспериментальные группы: контрольные клетки без воздействий; клетки, обработанные ФМК; клетки, стимулированные инсулином; клетки, обработанные ФМК и стимулированные инсулином. Для обработки клетки помещали в среду, содержащую 1 мМ ФМК, на 24 ч, после чего в течение 2 ч клетки инкубировали в бессывороточной среде, дважды отмывали ледяным раствором Кребса—Рингера и оставляли в нем на 10 мин. Инсулин для стимуляции добавляли в среду в количестве 20 нМ. Продолжительность стимуляции составляла 20 мин.

Потребление глюкозы оценивали с помощью коммерчески доступного набора реагентов (ab136955; Abscam, США). Адипоциты дважды отмывали фосфатным буфером и инкубировали в бессывороточной среде в течение ночи в 96-луночных планшетах. Клетки отмывали от среды и помещали в 100 мкл раствора Кребса—Рингера, содержащего 2 % бычьего сывороточного альбумина (BSA), на 40 мин. В двух группах проводили стимуляцию инсулином (1 мкМ) в течение 20 мин. В лунки добавляли по 10 мкл раствора 2-дезоксиглюкозы (2-ДОГ, 10 мМ), после чего клетки разрушали 80 мкл буфера для экстракции, замораживали, оттаивали и инкубировали при 85 °C в течение 40 мин. Клеточные лизаты охлаждали на льду и добавляли буфер для нейтрализации. После добавления реакционной смеси А клетки инкубировали при 37 °C в течение 1 ч. На последнем этапе добавляли реакционную смесь В и оценивали поглощение при 412 нм. Потребление глюкозы рассчитывали по калибровочной кривой.

Окрашивание масляным красным О и количественная оценка липидов. Раствор красителя готовили в день эксперимента путем растворения 300 мг порошка красителя в 100 мл чистого изопропанола. Клетки отмывали фосфатно-солевым раствором (PBS, pH 7.4) и фиксировали в течение 1 ч в 10%-ном забуференном формальдегиде. Затем клетки промывали и инкубировали в растворе масляного красного О 15 мин при комнатной температуре. Изображения получали на микроскопе Axiophot (Carl Zeiss, Германия). Для количественного определения липидных отложений из адипоцитов выделяли окрашенное содержимое и оценивали его по поглощению при 500 нм с использованием многоканального спектрофотометра.

Количество лептина и адипонектина в средах культивирования оценивали с использованием коммерческих наборов для иммунофлуоресцентного анализа (ab100718 и ab108785 соответственно; Abscam, США) согласно инструкциям изготовителя.

Экстракция белков и Вестерн-блот-анализ. Клетки промывали PBS и добавляли в лунки по 100 мкл лизирующего буфера: 1 % Тритона X-100, 1 % SDS, 1 мМЭДТА, 1 мМРМФСF, 2 мМNa₃VO₄ и 1 мМNaF. Лизис вели на льду в течение 45 мин, лизаты отбирали и центрифугировали при 4 °С в течение 20 мин при 14 000 g. Для дальнейшего анализа белков к супернатантам добавляли буфер для нанесения и кипятили в течение 10 мин. Полученную смесь разделяли электрофоретически в системе Mini-PROTEAN® TGX™ (BioRad, США), переносили белки с геля на мембрану PVDF и инкубировали в блокирующем буфере, содержащем 5 % БСА, в течение 1 ч. Мембраны инкубировали в течение ночи с первичными антителами (Abscam США), разведенными в 1%-ном БСА, используя следующие поликлональные антитела кролика: против GLUT1 (1 : 1000), против GLUT4 (1 : 2000), против PIP3 (1 : 500), против рап-АКТ (3 : 2000), против АКТ1 (фосфо-s473) (1 : 1200), против PTEN (A2B1) (1 : 500) и p-PTEN (ser370) (1 : 500) и против FABP4/AP2 (1 : 1000). Против PARK-7 использовали козы антитела (1 : 2000). Мембраны промывали и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре в соответствующих вторичных антителах, конъюгированных с пероксидазой хрена (Promega, США), разведенных в 1%-ном БСА. После промывки мембраны инкубировали в соответствии с ECL-протоколом (GE Healthcare, США). Хемиллюминесценцию визуализировали и количественно оценивали с использованием системы ChemiDoc (tm) MP (BioRad, США).

Иммуноцитохимическое исследование. Клетки помещали на покровные стекла и обрабатывали в течение 24 ч ФМК или оставляли без обработки. Клетки фиксировали 4 %-ным параформальдегидом в течение 10 мин и обрабатывали 0.5%-ным раствором X-Тритона 100 в течение 15 мин на льду. Для блокирования неспецифического связывания клетки инкубировали в 1%-ном БСА, после чего добавляли первичные поликлональные антитела кролика против GLUT4 (1 : 1000) и инкубировали в течение ночи. После отмычки проводили инкубацию в течение 2 ч с соответствующими вторичными антителами, конъюгированными с флуорофором (1 : 400). Изображения получали на конфокальном микроскопе Nikon Eclipse (об. 60×1.4 NA) с программным обеспечением IPLab Spectrum (VayTek, США). Анализ изображений проводили в программе Image J (NIH, США).

Статистический анализ. Все эксперименты повторяли 4—8 раз. Данные представлены как среднее и их стандартное отклонение. Для сравнения средних использовали *t*-критерий, различия считали статистически значимыми при *P* < 0.05.

Результаты

На первом этапе настоящей работы мы подтвердили, что ФМК не влияет на уровень дифференцировки зрелых адипоцитов 3T3-L1. ФМК добавляли в лунки через 14 сут дифференцировки, контролируя отсутствие изменений в жизнеспособности клеток по добавлению трипанового синего (данные не представлены). Окрашивание клеток масляным красным O не выявило влияния ФМК на морфологию зрелых адипоцитов (рис. 1, а). Кроме того, после культивирования в присутствии ФМК мы не наблюдали появления существенных изменений в накоплении липидных отложений, что демонстрируется микрофото-

графиями и подтверждено количественно (рис. 1, б). Кроме того, количественно определили также маркер дифференцировки AP2/FABP4, подтвердив отсутствие различий между контрольными клетками и обработанными ФМК (рис. 1, в, г).

Для оценки влияния ФМК на секрецию адипокинов мы оценили уровень лептина и адипонектина в средах от контрольных клеток и обработанных ФМК. Нами отмечено значительное снижение секреции лептина в ответ на действие ФМК (рис. 2, а), в то время как содержание адипонектина осталось тем же (рис. 2, б).

Чтобы определить влияние ФМК на поглощение глюкозы, мы провели колориметрический анализ поглощения глюкозы культивируемыми адипоцитами после добавления только ФМК и после добавления ФМК в сочетании со стимулирующей инсулином. Действие ФМК приводит почти к 2.5-кратному увеличению потребления глюкозы по сравнению с контролем (25 ± 4.5 и 9 ± 2.2 пмоль в лунке соответственно). Аналогичное увеличение мы наблюдали после стимуляции инсулином. Сочетанное действие стимуляции инсулином и ФМК привело к дальнейшему увеличению уровня потребления глюкозы до 30 ± 2 пмоль в лунке (рис. 3). Далее мы исследовали влияние ФМК на содержание в культивируемых адипоцитах основных транспортеров глюкозы. Мы обнаружили, что обработка ФМК значительно увеличивает количество GLUT-1 по сравнению с необработанными клетками (рис. 4, а). Изменений в общем количестве GLUT-4 после добавления ФМК мы не выявили (рис. 4, б).

На следующем этапе мы исследовали влияние ФМК на экспрессию белков PIP3, pAkt, pPTEN и PARK7. Мы оценили влияние ФМК на белки инсулинового сигнального каскада. 24-часовая обработка ФМК клеток значительно увеличивала экспрессию PIP3 (рис. 4, в) и pAkt (рис. 4, г) по сравнению с контролем. Кроме того, мы обнаружили значительное увеличение неактивной формы PTEN (pPTEN) после обработки ФМК (рис. 4, д) по сравнению с контролем. Наши данные также показали, что ФМК значительно увеличивала экспрессию PARK-7 относительно контроля в дифференцированных адипоцитах 3T3-L1 (рис. 4, е).

Иммуноцитохимический анализ показал, что при добавлении ФМК увеличивается мембранная экспрессия белка GLUT-4. Клетки окрашивали антителами против GLUT-4 и визуализировали на конфокальном микроскопе для качественной оценки распределения внутриклеточного GLUT-4 (рис. 5, а). После 24-часовой обработки ФМК мы наблюдали явное перераспределение GLUT-4 по сравнению с контрольными клетками: отмечалась периферическая локализация сигнала рядом с плазматической мембраной и в везикулах. Однако при оценке общей флуоресценции GLUT-4 разницы между контрольными клетками и обработанными ФМК мы не выявили (рис. 5, б).

Обсуждение

В настоящей работе мы выделили несколько особенностей влияния ФМК на поглощение глюкозы адипоцитами. Поглощение глюкозы значительно возрастает при обработке адипоцитов ФМК, и эта разница еще больше, когда действие ФМК сочетается со стимуляцией инсулином. ФМК увеличивает общее содержание в клетке

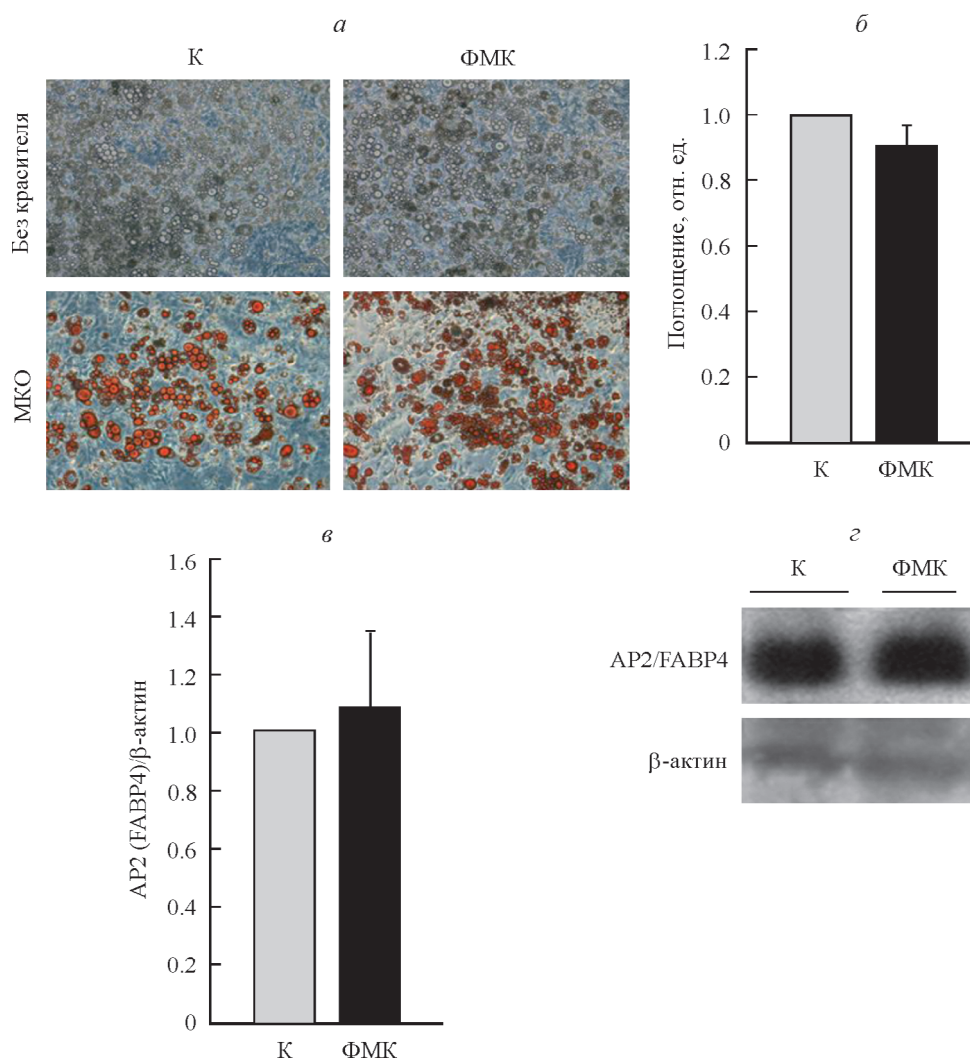


Рис. 1. Накопление липидных отложений (а, б) и содержание маркера дифференцировки AP2/FABP4 (в) в адипоцитах 3T3-L1 без воздействия (К) и при инкубации с фенилмасляной кислотой (ФМК) в течение 1 сут.

а — микрофотографии адипоцитов без красителя и окрашенных масляным красным О (МКО). б — диаграмма, показывающая поглощение липидных отложений, выделенных из адипоцитов и окрашенных МКО при 500 нм. в — результаты денситометрии полос Вестерн-блота с антителами против маркера дифференцировки AP2/FABP4, нормированных относительно β-актина; по вертикали — интенсивность хемилюминесцентного сигнала, отн. ед. г — типичные результаты Вестерн-блот-анализа. Представлены средние значения (б, в; n = 4), вертикальные отрезки — стандартное отклонение.

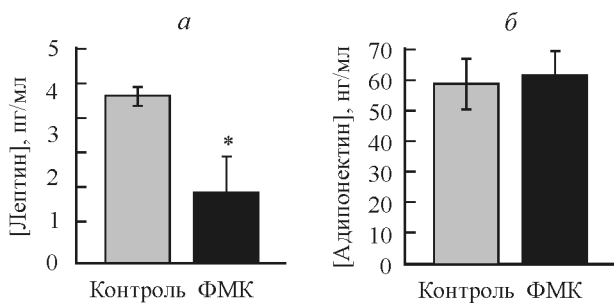


Рис. 2. Содержание адипокинов лептина (а) и адипонектина (б) в среде поддержания клеток без воздействия (контроль) и через 1 сут действия с ФМК.

Представлены средние значения (n = 8) и стандартного отклонения (вертикальные отрезки), звездочка — P < 0.05.

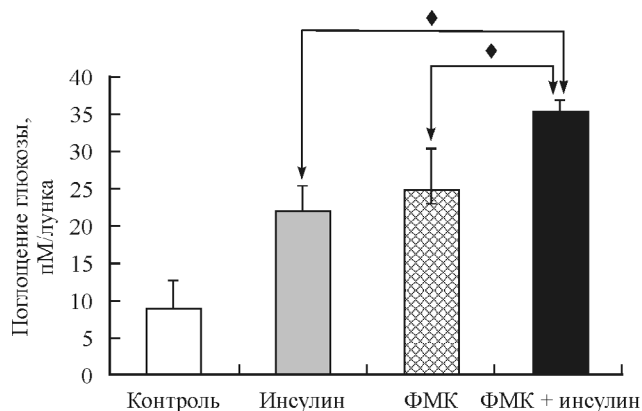


Рис. 3. Уровень поглощения глюкозы 3T3-L1 адипоцитами без воздействия (контроль), после стимуляции инсулином, 24-часового действия ФМК и после комбинированного действия инсулина и ФМК.

Данные представлены в виде среднего (n = 8) и стандартного отклонения (вертикальные отрезки), черный ромб — P < 0.05.

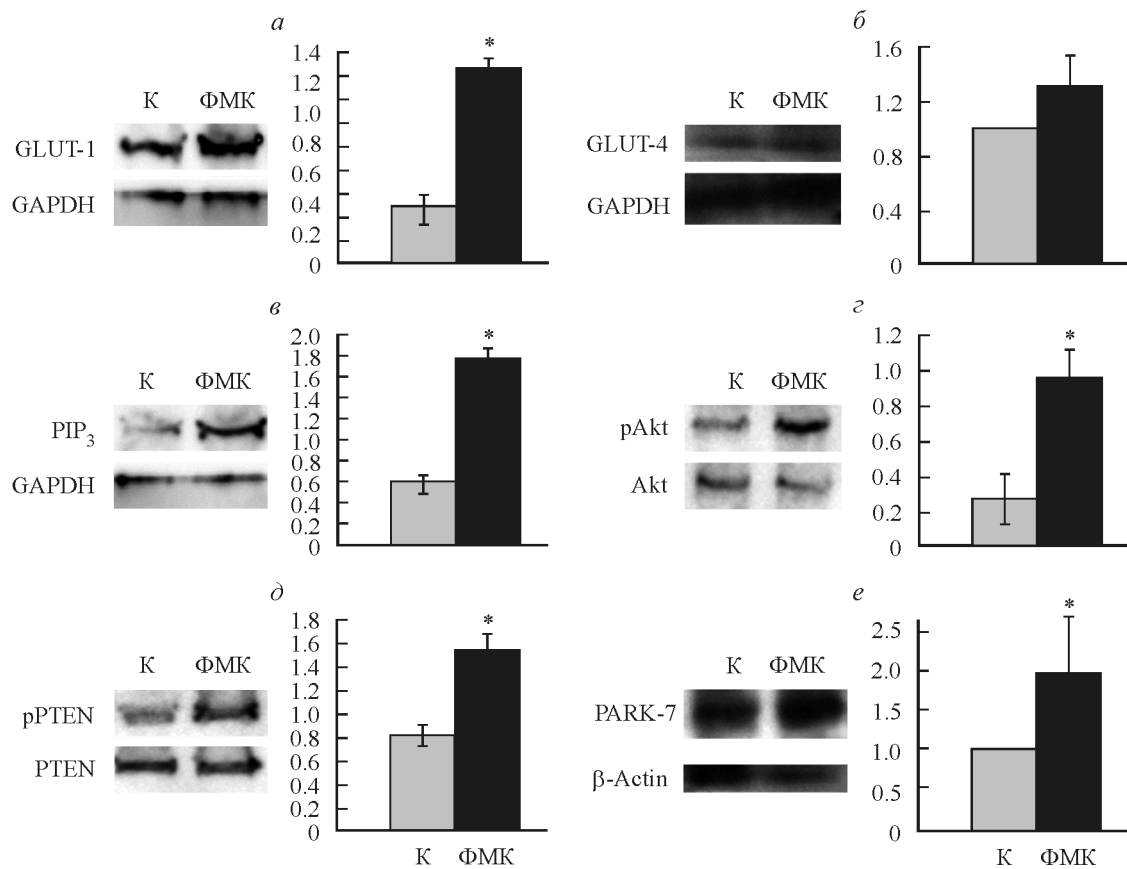


Рис. 4. Содержание белков, участвующих в передаче инсулинового сигнала, в клетках без воздействия (К) и после 24-часового действия ФМА: GLUT1 (а), GLUT4 (б) и PIP₃ (в), нормированных относительно GAPDH; pAkt (г) и pPTEN (д), нормированные относительно своих нефосфорилированных форм; PARK7 (е), нормированного относительно β-актина. Вестерн-блот-анализ. Диаграммы *справа* показывают результаты денситометрии полос блота; *по вертикали* — интенсивность хемиллюминесценции, отн. ед.; показаны средние значения (n = 4) и стандартные отклонения (*вертикальные отрезки*), *звездочка* — $P < 0.05$.

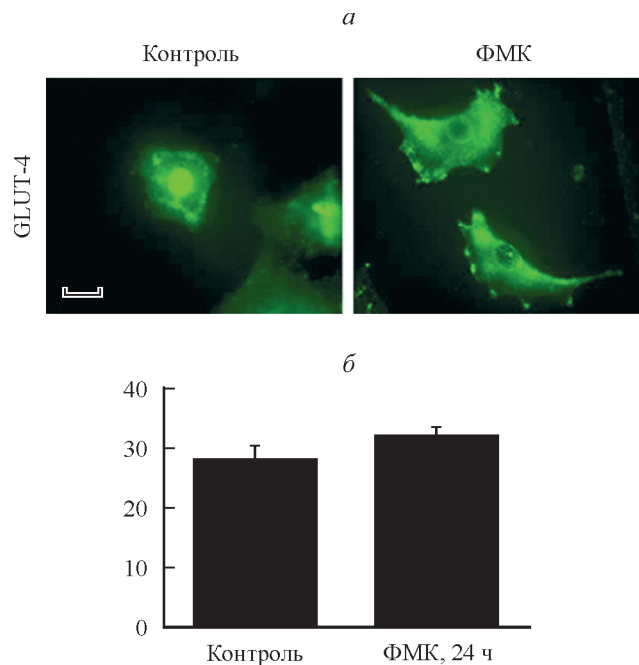


Рис. 5. Локализация глюкозного транспортера 4-го типа (GLUT-4) (а) и общая интенсивность флуоресцентного сигнала (б) в адипоцитах 3Т3-Л1 после обработки ФМК по сравнению с контрольной группой.

Использовали антитела против GLUT-4. Диаграмма показывает результаты денситометрии флуоресцентного сигнала микрофотографий (средние значения и стандартные отклонения); *по вертикали* — интенсивность флуоресцентного сигнала, отн. ед.

GLUT-1 и долю GLUT-4, локализованного на плазматической мембране. ФМК стимулирует PI3K-сигнальный путь, увеличивая содержание PIP3, pPTEN и pAkt. Кроме того, ФМК не влияет на секрецию адипонектина, но значительно снижает секрецию лептина в зрелых адипоцитах 3T3-L1.

Для подтверждения того, что полученные результаты не связаны с влиянием ФМК на степень дифференцировки клеток, мы оценили накопление в них липидных включений и экспрессию маркера дифференциации AP2. Мы не наблюдали влияния ФМК на жизнеспособность клеток, что совпадает с данными, полученными другими авторами (Hu et al., 2014). После обработки ФМК клетки не отличались от контрольных ни по накоплению липидных отложений, ни по морфологии полностью зрелых адипоцитов. Есть данные о том, что обработка ФМК незрелых преадипоцитов в течение 5 сут влияет на степень их дифференцировки и адипогенез (Basseri et al., 2009). Однако в настоящей работе 24-часовая обработка ФМК уже зрелых адипоцитов не усилила и не ослабила степень их дифференцировки. Таким образом, маловероятно, что изменения дифференцировки адипоцитов могут изменить наши результаты.

Инсулин стимулирует поглощение глюкозы адипоцитами 3T3-L1, индуцируя транслокацию GLUT-4 из внутриклеточных везикул к плазматической мембране дозозависимым образом (Govers et al., 2004). В среднем полупериод транслокации GLUT-4 к плазматической мембране составляет 230 мин, инсулин снижает этот показатель до 9 мин, увеличивая таким образом поглощение глюкозы (Karylowski et al., 2004). Мы показали, что ФМК значительно увеличивает поглощение глюкозы аналогично действию инсулина. Более того, когда действие ФМК сочетается со стимуляцией инсулином, поглощение глюкозы возрастает еще больше. Полученные данные позволяют предположить, что ФМК может оказывать инсулиносенсибилизирующее действие. Это предположение вполне согласуется с ранее проведенными исследованиями инсулиносенсибилизирующего действия ФМК на мышечные трубочки клеток C2C12 (Hu et al., 2014). В целом мы считаем, что можно говорить о возможной роли ФМК в поглощении клеткой глюкозы, стимулируемом инсулином.

GLUT-4 — один из ключевых белков, участвующих в поглощении глюкозы, уровень которого заметно снижается при диабете II типа (Li et al., 2000). Поэтому одной из задач настоящей работы стало изучение влияния ФМК на содержание этого белка в клетках. При сравнении общего количества GLUT-4 в контрольных клетках и обработанных ФМК с помощью иммуноцитохимии и Вестерн-блот-анализа мы не увидели различий, что не соответствовало данным из литературы. Так, Ху с соавторами отмечают возрастание уровня экспрессии гена *GLUT4* в мышечных трубочках клеток C2C12 после обработки ФМК (Hu et al., 2014). Тем не менее в нашей модели мы наблюдали большое количество мембранного GLUT-4. Возможно, показанное нами возрастание потребления глюкозы связано с определенным событием на посттрансляционном уровне, например с мобилизацией везикул GLUT-4, подобно тому как это происходит при стимуляции инсулином. Кроме того, содержание GLUT-1 значительно увеличивается после обработки ФМК, что также может объяснять, по крайней мере частично, возрастание потребления глюкозы. В связи с тем что стимуляция инсулином усиливает транслокацию GLUT-1 к плазматической мембране (Gould et al., 1993), наблюдаемое

действие ФМК на GLUT-1 может также быть вызвано усилением транспорта белков, которое подтверждено для GLUT-4.

Работа глюкозных транспортеров положительно регулируется PI3K-сигнальным путем, антагонистом которого в свою очередь выступает PTEN4 (PIP3-фосфатаза), которая негативно регулирует сигнальный путь инсулин/PI3K/Akt (Taniguchi et al., 2006). Активность PTEN модулируется окислением или фосфорилированием. Мы показали, что ФМК увеличивает фосфорилирование PTEN, что способствует снижению активности фосфатазы. Мы также показали, что при обработке ФМК в адипоцитах возрастает количество PIP3, что приводит к увеличению количества фосфорилированной формы киназы Akt, свидетельствующему о ее активации. Это усиливает сигнальный каскад и приводит к увеличению транспорта глюкозных транспортеров к плазматической мембране и к возрастанию поглощения глюкозы.

Белок PARK-7, ингибирующий PTEN, также активируется ФМК, как было показано ранее (Zhou et al., 2011). Можно предположить, что ФМК действует опосредованно, активируя PARK-7 и подавляя, таким образом, ингибитор инсулинового сигнального пути PTEN. PARK-7 является многофункциональным белком, уровень экспрессии которого снижен в островках поджелудочной железы больных диабетом II типа и который может играть ключевую роль в поддержании глюкозного баланса (Jain et al., 2012). В настоящей работе мы показали, что уровень PARK-7 возрастает после обработки ФМК. Однако эти данные просто подразумевают, но не подтверждают участие PARK-7 в механизме действия ФМК. Зависимость действия ФМК от активации PARK-7 показана в литературе на других моделях. Так, ФМК увеличивала экспрессию *PARK7* в культуре нейронов, и это увеличение было необходимо для активизации нейропротекторного действия ФМК (Zhou et al., 2011).

В своей работе мы сосредоточились на взаимосвязи инсулинового сигнала и механизма действия ФМК с PI3-киназным сигнальным путем. Однако ФМК может влиять и на другие сигнальные пути. Так, исследования на мышцах показали, что введение с пищей бутирата натрия увеличивает чувствительность к инсулину, стимулируя коактиватор рецептор гамма 1-альфа (PGC-1 α), активируемый пероксисомными пролифераторами, и увеличивая активность АМФ-зависимой протеинкиназы (АМФК) (Gao et al., 2009). Уровень фосфорилирования АМФК и p38 также возрастал при добавлении бутирата натрия к культивируемым клеткам, что позволило предположить возможность прямой активации АМФК индукцией уровня АМФ (Gao et al., 2009). Схожим образом, активируя АМФК, бутират участвует в регуляции образования плотных контактов кишечника (Peng et al., 2009). АМФК участвует в регуляции экспрессии *GLUT4*, фосфорилируя гистоновую деацетилазу-5 в скелетной мышечной ткани человека (McGee et al., 2008). ФМА, будучи ингибитором гистоновых деацетилаз, может усиливать поглощение глюкозы, взаимодействуя с участниками АМФК-сигнального пути.

ФМК является производным масляной (бутановой) кислоты, из-за чрезвычайно короткого периода полувыведения из организма она обладает незначительным действием *in vivo* (Berger et al., 2010). Жирные кислоты с короткими цепочками, такие как бутираты, выделяются при переработке пищевых волокон микрофлорой кишечника, и их набор и количество зависят от физиологического со-

стояния хозяина (Chrietti, Pirola, 2015). У пациентов с диабетом II типа часто диагностируют дисбактериоз кишечника со снижением содержанием бактерий, производящих бутират (Chrietti, Pirola, 2015). Показано, что бутират может применяться для профилактики и лечения инсулинорезистентности, вызванной диетой, у мышей; при этом он снижает ожирение и улучшает липидный профиль крови (Gao et al., 2009). Высказано предположение о том, что диета, способствующая выделению жирных кислот с короткими цепочками в кишечнике, может положительно влиять на метаболические процессы всего организма (Chrietti, Pirola, 2015).

Последним ключевым участником в патогенезе инсулинорезистентности считаются адипокины, которые могут сдвигать глюкозный баланс (Lin et al., 2011). Основным среди них является адипокин лептин, участвующий в регуляции потребления энергии и пищи (Antuna-Puente et al., 2008). Показано, что 5-часовое внутривенное введение лептина мышам усиливает обмен веществ и потребление глюкозы (Kamohara et al., 1997). В других работах показано, что лептин в гипоталамусе усиливает поглощение глюкозы в периферических тканях, и сочетание лептина в центральных органах и инсулина в периферических значительно усиливает поглощение глюкозы тканью (Haque et al., 1999; Minokoshi et al., 1999). Согласно нашим результатам, снижение уровня лептина связано с увеличением поглощения глюкозы. В ряде работ показано, что некоторые соединения, увеличивающие поглощение глюкозы, могут одновременно ингибировать секрецию лептина у культивируемых адипоцитов. Есть доказательства того, что адипогенный аденовирус-36 человека снижает секрецию лептина и увеличивает поглощение глюкозы жировыми клетками (Vangipuram et al., 2007). Справедливо ли то же самое для ФМК, сказать трудно, но уже очевидно, что лептин оказывает сложное влияние на метаболизм, которое, несомненно, затрагивает и углеводный баланс.

В отличие от лептина уровень циркулирующего адипонектина снижен у пациентов с ожирением, страдающих диабетом II типа. Адипонектин способен увеличивать чувствительность к инсулину (Antuna-Puente et al., 2008). Мы не наблюдали разницы в уровне адипонектина в среде культивирования контрольных и экспериментальных групп клеток. И хотя уровень адипонектина оставался неизменным, добавление ФМК снизило отношение лептин/адипонектин в среде по сравнению с контролем. Соотношение этих адипокинов связано с различием индивидуальной чувствительности к инсулину и может объяснять метаболическую гетерогенность пациентов с ожирением (Al-Hamodi et al., 2014). Кроме того, многие исследователи предполагают, что соотношение лептин/адипонектин может значительно влиять на инсулинорезистентность и даже атерогенез у пациентов с диабетом II типа (Satoh et al., 2004; Al-Hamodi et al., 2014).

Таким образом, в настоящей работе мы показали, что ФМК оказывает положительное влияние на соотношение адипокинов, а также увеличивает поглощение глюкозы адипоцитами 3T3-L1. Механизм этого влияния может быть связан с модулированием инсулинового Р13К-сигнального пути и непосредственно с изменением активности PTEN посредством белка PARK-7. Полученные данные позволяют рассматривать ФМК и PARK-7 как перспективных участников терапии метаболического синдрома и сахарного диабета и предполагают их дальнейшее изучение.

Работа выполнена при финансовой поддержке Национального совета по научным исследованиям Ливана и Факультета медицины и медицинских наук Баламандского университета.

Список литературы

- Al-Hamodi Z., Al-Habori M., Al-Meeri A., Saif-Ali R. 2014. Association of adipokines, leptin/adiponectin ratio and C-reactive protein with obesity and type 2 diabetes mellitus. *Diabetol. Metab. Syndr.* 6 : 99-5996-6-99. eCollection.
- Antuna-Puente B., Feve B., Fellahi S., Bastard J. P. 2008. Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity. *Diabetes Metab.* 34 : 2—11.
- Basseri S., Lhotak S., Sharma A. M., Austin R. C. 2009. The chemical chaperone 4-phenylbutyrate inhibits adipogenesis by modulating the unfolded protein response. *J. Lipid Res.* 50 : 2486—2501.
- Berger J., Pujol A., Aubourg P., Forss-Petter S. 2010. Current and future pharmacological treatment strategies in X-linked adrenoleukodystrophy. *Brain Pathol.* 20 : 845—856.
- Carrera Boada C. A., Martinez-Moreno J. M. 2013. Pathophysiology of diabetes mellitus type 2: beyond the duo «insulin resistance-secretion deficit». *Nutr. Hosp.* 2 : 78—87.
- Chrietti S., Pirola L. 2015. Essential roles of four-carbon backbone chemicals in the control of metabolism. *World J. Biol. Chem.* 6 : 223—230.
- Chu E. C., Tarnawski A. S. 2004. PTEN regulatory functions in tumor suppression and cell biology. *Med. Sci. Monit.* 10 : 235—241.
- Cornell S. 2015. Continual evolution of type 2 diabetes: an update on pathophysiology and emerging treatment options. *Ther. Clin. Risk Manag.* 11 : 621—632.
- Da Costa C. A. 2007. DJ-1 : a newcomer in Parkinson's disease pathology. *Curr. Mol. Med.* 7 : 650—657.
- Deshpande A. D., Harris-Hayes M., Schootman M. 2008. Epidemiology of diabetes and diabetes-related complications. *Phys. Ther.* 88 : 1254—1264.
- Dimitriadis G., Mitrou P., Lambadiari V., Maratou E., Raptis S. A. 2011. Insulin effects in muscle and adipose tissue. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 93, Suppl. 1 : S52—S59.
- Gao Z., Yin J., Zhang J., Ward R. E., Martin R. J., Lefevre M., Cefalu W. T., Ye J. 2009. Butyrate improves insulin sensitivity and increases energy expenditure in mice. *Diabetes.* 58 : 1509—1517.
- Ge X., Chen C., Hui X., Wang Y., Lam K. S. L., Xu A. 2011. Fibroblast growth factor 21 induces glucose transporter-1 expression through activation of the serum response factor/Ets-like protein-1 in adipocytes. *J. Biol. Chem.* 286 : 34 533—34 541.
- Gould G. W., Holman G. D. 1993. The glucose transporter family: structure, function and tissue-specific expression. *Biochem. J.* 295 : 329—341.
- Govers R., Coster A. C., James D. E. 2004. Insulin increases cell surface GLUT4 levels by dose dependently discharging GLUT4 into a cell surface recycling pathway. *Mol. Cell. Biol.* 24 : 6456—6466.
- Haque M. S., Minokoshi Y., Hamai M., Iwai M., Horiuchi M., Shimazu T. 1999. Role of the sympathetic nervous system and insulin in enhancing glucose uptake in peripheral tissues after intrahypothalamic injection of leptin in rats. *Diabetes.* 48 : 1706—1712.
- Hauner H., Roëhrig K., Spelleken M., Liu L. S., Eckel J. 1998. Development of insulin-responsive glucose uptake and GLUT4 expression in differentiating human adipocyte precursor cells. *Int. J. Obes.* 22 : 448—453.
- Hu H., Li L., Wang C., He H., Mao K., Ma X., Shi R., Oh Y., Zhang F., Lu Y., Wu Q., Gu N. 2014. 4-Phenylbutyric acid increases GLUT4 gene expression through suppression of HDAC5 but not endoplasmic reticulum stress. *Cell Physiol. Biochem.* 33 : 1899—1910.
- Iannitti T., Palmieri B. 2011. Clinical and experimental applications of sodium phenylbutyrate. *Drugs RD.* 11 : 227—249.

- Jain D., Jain R., Eberhard D., Eglinger J., Bugliani M., Piemonti L., Marchetti P., Lammert E. 2012. Age- and diet-dependent requirement of DJ-1 for glucose homeostasis in mice with implications for human type 2 diabetes. *J. Mol. Cell Biol.* 4 : 221—230.
- Kamohara S., Burcelin R., Halaas J. L., Friedman J. M., Charbon M. J. 1997. Acute stimulation of glucose metabolism in mice by leptin treatment. *Nature.* 389 : 374—377.
- Karylowski O., Zeigerer A., Cohen A., McGraw T. E. 2004. GLUT4 is retained by an intracellular cycle of vesicle formation and fusion with endosomes. *Mol. Biol. Cell.* 15 : 870—882.
- Kim J. M., Jang H. J., Choi S. Y., Park S. A., Kim I. S., Yang Y. R., Yang H. L., Sung H. R., Pann-Grill S. 2014. DJ-1 contributes to adipogenesis and obesity-induced inflammation. *Sci. Rep.* 4 : doi: 10.1038/srep04805.
- Kim R. H., Peters M., Jang Y., Shi W., Pintilie M., Fletcher G. C., DeLuca C., Liepa J., Zhou L., Snow B., Binari R. C., Manoukian A. S., Bray M. R., Liu F. F., Tsao M. S., Mak T. W. 2005. DJ-1, a novel regulator of the tumor suppressor PTEN. *Cancer Cell.* 7 : 263—273.
- Kim Y. C., Kitaura H., Taira T., Iguchi-Arigo S. M., Ariga H. 2009. Oxidation of DJ-1-dependent cell transformation through direct binding of DJ-1 to PTEN. *Int. J. Oncol.* 35 : 1331—1341.
- Li J., Houseknecht K. L., Stenbit A. E., Katz E. B., Charbon M. J. 2000. Reduced glucose uptake precedes insulin signaling defects in adipocytes from heterozygous GLUT4 knockout mice. *FASEB J.* 14 : 1117—1125.
- Lin H. V., Ren H., Samuel V. T., Lee H. Y., Lu T. Y., Shulman G. I., Accili D. 2011. Diabetes in mice with selective impairment of insulin action in Glut4-expressing tissues. *Diabetes.* 60 : 700—709.
- McGee S. L., van Denderen B. J., Howlett K. F., Mollica J., Schertzer J. D., Kemp B. E., Hargreaves M. 2008. AMP-activated protein kinase regulates GLUT4 transcription by phosphorylating histone deacetylase 5. *Diabetes.* 57 : 860—867.
- Minokoshi Y., Haque M. S., Shimazu T. 1999. Microinjection of leptin into the ventromedial hypothalamus increases glucose uptake in peripheral tissues in rats. *Diabetes.* 48 : 287—291.
- Nugent C., Prins J. B., Whitehead J. P., Savage D., Wentworth J. M., Chatterjee V. K., O'Rahilly S. 2001. Potentiation of glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes by PPAR agonists is maintained in cells expressing a PPAR dominant-negative mutant: evidence for selectivity in the downstream responses to PPAR activation. *Mol. Endocrinol.* 15 : 1729—1738.
- Ozcan U., Yilmaz E., Ozcan L., Furuhashi M., Vaillancourt E., Smith R. O., Gorgun C. Z., Hotamisligil G. S. 2006. Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science.* 313 : 1137—1140.
- Peng L., Li Z. R., Green R. S., Holzman I. R., Lin J. 2009. Butyrate enhances the intestinal barrier by facilitating tight junction assembly via activation of AMP-activated protein kinase in Caco-2 cell monolayers. *J. Nutr.* 139 : 1619—1625.
- Perrini S., Natalicchio A., Laviola L., Belsanti G., Montrone C., Cignarelli A., Minielli V., Grano M., De Pergola G., Giorgino R., Giorgino F. 2004. Dehydroepiandrosterone stimulates glucose uptake in human and murine adipocytes by inducing GLUT1 and GLUT4 translocation to the plasma membrane. *Diabetes.* 53 : 41—52.
- Roach W., Plomann M. 2007. PACSIN3 overexpression increases adipocyte glucose transport through GLUT1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 355 : 745—750.
- Satoh N., Naruse M., Usui T., Tagami T., Suganami T., Yamada K., Kuzuya H., Shimatsu A., Ogawa Y. 2004. Leptin-to-adiponectin ratio as a potential atherogenic index in obese type 2 diabetic patients. *Diabetes Care.* 27 : 2488—2490.
- Savage D. B., Petersen K. F., Shulman G. I. 2005. Mechanisms of insulin resistance in humans and possible links with inflammation. *Hypertension.* 45 : 828—833.
- Shang W., Yang Y., Zhou L., Jiang B., Jin H., Chen M. 2008. Ginsenoside Rb1 stimulates glucose uptake through insulin-like signaling pathway in 3T3-L1 adipocytes. *J. Endocrinol.* 198 : 561—569.
- Taniguchi C. M., Emanuelli B., Kahn C. R. 2006. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7 : 85—96.
- Vangipuram S. D., Yu M., Tian J., Stanhope K. L., Pasari-ca M., Havel P. J., Heydari A. R., Dhurandhar N. V. 2007. Adipogenic human adenovirus-36 reduces leptin expression and secretion and increases glucose uptake by fat cells. *Int. J. Obes. (London).* 31 : 87—96.
- Vega G. L., Grundy S. M. 2013. Metabolic risk susceptibility in men is partially related to adiponectin/leptin ratio. *J. Obes.* 2013 : 409679.
- Wild S., Roglic G., Green A., Sicree R., King H. 2004. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care.* 27 : 1047—1053.
- Xu T. Y., Chen R. H., Wang P., Zhang R. Y., Ke S. F., Miao C. Y. 2010. 4-Phenyl butyric acid does not generally reduce glucose levels in rodent models of diabetes. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 37 : 441—446.
- Zhou W., Bercury K., Cumiskey J., Luong N., Lebin J., Freed C. R. 2011. Phenylbutyrate up-regulates the DJ-1 protein and protects neurons in cell culture and in animal models of Parkinson disease. *J. Biol. Chem.* 286 : 14 941—14 951.

Поступила 4 VII 2017

ENHANCED GLUCOSE UPTAKE IN PHENYLBUTYRIC ACID-TREATED 3T3-L1 ADIPOCYTES

H. Fakhoury,¹ S. Osman,¹ N. Ghazale,² N. Dahdah,¹ M. El-Sibai,² A. Kanaan¹, *

¹ Department of Biomedical Sciences, Faculty of Medicine and Medical Sciences, University of Balamand, El-Kurah, Lebanon,

and ² Department of Natural Sciences, School of Arts and Sciences, Lebanese American University, Beirut, Lebanon;

* e-mail: amjad.kanaan@balamand.edu.lb

Diabetes mellitus is a chronic metabolic disease marked by altered glucose homeostasis and insulin resistance. The phosphatase PTEN antagonizes the insulin-induced-PI3K-driven cascade that normally leads to GLUT4 membrane translocation. This study investigates the effect of phenylbutyric acid (PBA), a chemical chaperone and a potential mediator of PTEN activity, on glucose uptake in differentiated 3T3-L1 adipocytes. Adipocyte differentiation status was quantified by Oil Red O staining and the expression of AP2. Baseline and insulin-induced adipocyte glucose uptake were assayed with and without PBA treatment. Expression of GLUT1, GLUT4, PIP3, pAkt, pPTEN, and PARK-7 was examined by western blot. Plasma membrane expression of GLUT4 was determined using immunofluorescence. Leptin and adiponectin secretion was measured by enzyme-linked immunosorbent assay. PBA treatment, alone or with insulin induction, significantly increased

glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. PBA significantly increased GLUT1 but not GLUT4 total protein expression. However, a significant increase in membrane GLUT4 protein translocation was observed. The expression of PIP3 and pAkt increased indicating enhanced PI3K pathway activity. There was a significant decrease in PTEN activity as evident by a rise in the phosphorylated form of this protein. PARK7 protein expression increased with PBA. Treating differentiated adipocytes with PBA did not alter their differentiation status, but decreased the leptin to adiponectin ratio. In conclusion, this study showed that PBA enhances adipocyte glucose uptake potentially through its effect on glucose transporter expression and/or trafficking via the PI3K signaling pathway; suggesting PBA as a possible candidate for the ancillary management of diabetes.

Key words: adipocytes, glucose uptake, phenylbutyric acid, diabetes, PARK-7.
