

На правах рукописи

Тофило Мария Александровна

**РОЛЬ АССОЦИИРОВАННЫХ С АДИПОГЕНЕЗОМ микроРНК
В ПАТОГЕНЕЗЕ ИНСУЛИНОРЕЗИСТЕНТНОСТИ
ПРИ АЛИМЕНТАРНО-КОНСТИТУЦИОНАЛЬНОМ ОЖИРЕНИИ**

14.03.03 Патологическая физиология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Тверь — 2022

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Тверской государственной медицинской академии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель

доктор медицинских наук, доцент

Егорова Елена Николаевна

Официальные оппоненты

доктор медицинских наук

Костарева Анна Александровна

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Институт молекулярной биологии и генетики, директор института

доктор медицинских наук, профессор

Благонравов Михаил Львович

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, Медицинский институт, кафедра общей патологии и патологической физиологии имени В.А. Фролова, заведующий кафедрой

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации
Защита состоится «__» _____ 2022 года в 14.00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.072.05 на базе федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д.1.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России по адресу: 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1 и на сайте www.rsmu.ru

Автореферат разослан «__» _____ 2022 года

Ученый секретарь

диссертационного совета,

кандидат медицинских наук, доцент

Кузнецова Татьяна Евгеньевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Ожирение — одна из глобальных медицинских и социальных проблем XXI века, обязательное условие для развития метаболического синдрома (МС). Основным механизмом развития МС является инсулинорезистентность и компенсаторная гиперинсулинемия, развившиеся при чрезмерном накоплении висцерального жира, то есть алиментарно-конституциональном (экзогенно-конституциональном) ожирении, на долю которого в структуре ожирения приходится 95–99 % [Дедов И.И., 2019].

Для понимания патогенетических механизмов формирования МС с целью обоснования патогенетической профилактики и лечения его осложнений были проведены многочисленные биохимические, иммунологические, генетические исследования [Meydan T. S., Soreq H., 2016; Oh K. J. et al., 2016]. В настоящее время на этом пути достигнуты определенные успехи, однако молекулярные механизмы регуляции адипогенеза, развития ожирения и инсулинорезистентности изучены недостаточно. Большой научный интерес в этом плане представляет изучение возможной роли микроРНК — новых регуляторных молекул, открытых менее тридцати лет назад.

В 1993 году R.C. Lee, R.L. Feinbaum, V. Ambros впервые обнаружили малую некодирующую РНК, регулирующую морфогенез у нематоды *Caenorhabditis elegans*. Позднее сотрудниками лаборатории G. Ruvkun было выявлено присутствие этих молекул, названных микроРНК, у растений, животных и человека. МикроРНК — постраскрипционные регуляторные молекулы — стали рассматривать как потенциальных участников реализации молекулярных механизмов нормальных физиологических процессов [Victoria B. et al., 2017] и патогенеза широкого круга заболеваний — сердечно-сосудистых, печени, почек, легких, опухолей [Bhaskaran M., Mohan M., 2014].

Активный научный поиск, ориентированный на микроРНК, экспрессия которых ассоциирована с чувствительностью к глюкозе, метаболизмом липидов и ожирением [Kirby T. J. et al., 2016] вызван многообещающими перспективами их практического применения в качестве лабораторных биомаркеров для диагностики, мониторинга эффективности лечения, а также прогноза инсулинорезистентности и сахарного диабета, что связано с их постпрандиальной стабильностью, а также информативностью уже на латентной стадии [Щербо С.Н., Щербо Д.С., 2016]. Кроме этого, благодаря развитию фармацевтической химии появилась возможность использования для терапии инсулинорезистентности искусственно синтезированных

олигорибонуклеотидных последовательностей микроРНК и их антагонистов (анти-микроРНК) [Nigi L. et al., 2018].

Степень разработанности темы исследования. После доказательства повышения экспрессии микроРНК семейства let-7 у трансгенных мышей с моделированной инсулинорезистентностью [Zhu H. et al., 2011], у больных сахарным диабетом 2 типа в мышцах и поджелудочной железе [Jiang L.Q. et al., 2013], проводится поиск микроРНК-кандидатов, вероятных регуляторов процессов адипогенеза и инсулинорезистентности [Oh K. J. et al., 2016].

Цель исследования: выявить роль ассоциированных с адипогенезом микроРНК в патогенезе инсулинорезистентности при алиментарно-конституциональном ожирении.

Задачи исследования:

1. Оценить экспрессию miR-29b, -126, -132, -143, -155 и -375 в висцеральной жировой ткани и их содержание в крови у больных алиментарно-конституциональным ожирением по сравнению с метаболически некомпromетированными лицами.

2. Изучить различия экспрессии в висцеральной жировой ткани и содержания циркулирующих в крови miR-29b, -126, -132, -143, -155 и -375 в зависимости от уровня чувствительности к инсулину — у больных ожирением с сахарным диабетом 2 типа и без него.

3. Изучить взаимосвязь уровней экспрессии miR-29b, -126, -132, -143, -155 и -375 в висцеральной жировой ткани и сыворотке крови с показателями углеводного и липидного обмена.

4. Оценить направленность влияния miR-29b, -126, -132, -143, -155 и -375 на процесс адипогенеза.

5. Оценить роль miR-29b, -126, -132, -143, -155 и -375 в патогенезе инсулинорезистентности при алиментарно-конституциональном ожирении.

Легитимность исследования. Пациенты, включенные в исследование, дали свое добровольное информированное согласие на участие в нем и публикацию его результатов. На проведение настоящего исследования получено разрешение Этического комитета ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России от 26 марта 2018 года.

Научная новизна исследования. Впервые определены уровни miR-29b, -126, -132, -143, -155 и -375 у женщин, больных ожирением, как в висцеральной жировой ткани, так и циркулирующих в крови.

Впервые показана корреляция уровней miR-29b, -126, -132, -143, -155 и -375 в висцеральной жировой ткани и в сыворотке крови с антропометрическими характеристиками и с показателями углеводного и липидного обменов пациентов.

Получены новые данные о взаимосвязи уровней одноименных микроРНК в висцеральной жировой ткани и в сыворотке крови.

Впервые охарактеризована роль изученных микроРНК в патогенезе инсулинорезистентности: проинсулинорезистентные — miR-29b, -126, -143 и -375, антиинсулинорезистентные — miR-132 и -155.

Новизна полученных результатов подтверждается зарегистрированной базой данных «Биохимические показатели и экспрессия микроРНК в жировой ткани и в крови у пациентов с инсулинорезистентностью и ожирением и здоровых лиц» (свидетельство о государственной регистрации № 20200620016 от 09.01.2020 г.).

Теоретическая и практическая значимость. Результаты исследования существенно расширяют и углубляют существующие представления об участии микроРНК (miR-29b, miR-126, miR-132, miR-143, miR-155, miR-375) в патогенезе инсулинорезистентности и позволяют обосновать перспективность использования изученных микроРНК в медицине для диагностики и лечения.

Методология и методы исследования. Методология исследования основана на принципах доказательной медицины. В работе использованы методы теоретического познания (анализ, синтез, сравнение, построение гипотез), методы эмпирического характера (изучение научной литературы, наблюдение, измерение), математические методы (статистический анализ).

Положения, выносимые на защиту. У больных алиментарно-конституциональным ожирением уровни miR-29b, miR-126, miR-132, miR-143, miR-155, miR-375 в висцеральной жировой ткани и в сыворотке крови достоверно отличаются от таковых у лиц без ожирения.

Изученные микроРНК — miR-29b, miR-126, miR-132, miR-143, miR-155, miR-375 — ассоциированы с адипогенезом и инсулинорезистентностью.

Перспективны для дальнейшего изучения с целью использования в медицине: miR-29b, -143 и miR -155 — как лабораторные маркеры инсулинорезистентности, miR-29b, -143 и -375 — в качестве терапевтической мишени, miR-132 и -155 — как таргетированное лекарственное средство.

Степень достоверности результатов исследования. Достоверность результатов определяется изучением групп пациентов адекватных по клиническому статусу, с учетом статистически рассчитанного объема выборки, рациональным выбором методов исследования, использованием высоко чувствительных и специфичных наборов реактивов, современного

сертифицированного лабораторного оборудования, хранением полученных в исследовании результатов в компьютерной базе данных в программе Microsoft® Office® Excel® 2016 (Microsoft Corporation, Tulsa, USA), использованием адекватных методик статистической обработки данных исследования с помощью IBM® SPSS® Statistics 23.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA). Первичная документация результатов проведенного исследования проверена комиссией (акт проверки первичной научной документации от 11.03.2020).

Апробация результатов работы. Результаты исследования в виде устных или стендовых докладов представлены на российских и международных научно-практических форумах: VII Инновационный форум молодых ученых «Первые шаги к успеху», Тверь, ноябрь, 2015 г.; V Российский национальный конгресс лабораторной медицины, Москва, сентябрь, 2019 г.; XXI международный конгресс «Здоровье и образование в XXI веке: актуальные вопросы модернизации в медицине и образовании», Москва, декабрь, 2019 г.; VII Всероссийская межвузовская научно-практическая конференция молодых ученых с международным участием «Молодежь и медицинская наука», Тверь, декабрь, 2019 г.; Региональная научно-практическая конференция «Медицинская наука на Тверской земле: прошлое, настоящее, будущее», посвященная Дню Российской науки, Тверь, февраль, 2021 г.

Апробация материалов диссертационной работы проведена на расширенном заседании кафедр патологической физиологии, физиологии, биохимии с курсом клинической лабораторной диагностики, эндокринологии, факультетской терапии, госпитальной терапии, фармакологии и клинической фармакологии, биологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Тверской государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России) от 3 июня 2021 г., протокол №1.

Внедрение результатов исследования. Результаты исследования используются в учебном процессе на кафедрах патологической физиологии, эндокринологии ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России. Апробированные в ходе исследования методики определения и установленные региональные референсные значения лептина, адипонектина в крови, микроРНК в крови и жировой ткани используются в работе клинико-диагностической лаборатории поликлиники ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России.

Личный вклад автора в проведенное исследование. Лично автором выполнены: формулировка цели и задач исследования, набор фактического материала, лабораторные исследования (биохимические и молекулярно-

генетические), составлена база данных полученных результатов по группам исследования, проанализирована информация международных научных баз данных о внутриклеточных сигнальных путях адипогенеза, действия инсулина, воспаления и других, выполнена статистическая обработка полученных результатов, написан текст диссертации, самостоятельно сформулированы выводы и практические рекомендации, подготовлены статьи для публикации.

Публикации

Основные положения диссертации опубликованы в 12 научных публикациях, из которых 4 статьи — в рецензируемых журналах, рекомендуемых ВАК для опубликования основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук, и получено 1 свидетельство о государственной регистрации базы данных.

Объем и структура работы

Диссертационная работа изложена на 152 страницах текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, 3 глав результатов собственных исследований, главы обсуждения результатов исследования, выводов, практических рекомендаций, списка используемых сокращений, списка литературы. Список литературы содержит 266 источников, из них 16 отечественных и 250 зарубежных авторов. Диссертационная работа содержит 19 таблиц и иллюстрирована 10 рисунками.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводились на базе клиники и поликлиники ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России (главный врач д.м.н. Д.В. Федерякин). Клиническая часть исследования выполнялась в клинике университета: консультация эндокринолога к.м.н. М.Б. Лясниковой для адекватного деления обследованных пациентов на группы, забор образцов крови и жировой ткани — в хирургическом отделении (заведующий отделением А.Д. Сухов). Автор выражает искреннюю благодарность и глубокую признательность коллегам за неоценимую помощь в клиническом обследовании пациентов. Лабораторная часть исследования (биохимические, иммуноферментные и молекулярно-генетические) выполнялась диссертантом М.А. Тофило, врачом клинической лабораторной диагностики и лабораторным генетиком на базе биохимического и молекулярно-биологического отделов клинико-диагностической лаборатории поликлиники.

Дизайн исследования. Все женщины, включенные в настоящее исследование, проходили плановое лечение по поводу холецистита в хирургическом стационаре на базе клиники ФГБОУ ВО Тверского ГМУ Минздрава России. Критерии включения пациентов в основную группу

исследования: женщины возраста 37-68 лет, с ожирением и нарушением толерантности к глюкозе (инсулинорезистентность (ИР)) и с ожирением и сахарным диабетом 2 типа. Критерии включения пациентов в контрольную группу исследования: женщины возраста 37-68 лет без ожирения и без нарушения толерантности к глюкозе и сахарного диабета 2 типа. Критерии исключения пациентов из исследования: мужской пол, возраст младше 37 и старше 68 лет, наличие онкологических заболеваний, тяжелых соматических заболеваний (сердечно-сосудистой, легочной патологии, сахарного диабета 1 типа и других нарушений обмена). Настоящая работа является наблюдательным (наблюдательным), «случай-контроль» исследованием. **Основную группу** метаболически компрометированных пациентов составили 46 женщин с алиментарно-конституциональным ожирением и инсулинорезистентностью, средний возраст которых составил $55,0 \pm 1,4$ лет. Среди них 36 женщин ($54,0 \pm 1,7$ лет) имели лабораторные признаки нарушений углеводного обмена — ИР и 10 человек ($57,0 \pm 2,3$ лет; $p > 0,05$) — сахарный диабет 2 типа (СД 2 типа). Женщины обеих подгрупп — ИР и СД 2 типа — были сопоставимы по возрасту между собой и с группой в целом (все $p > 0,05$). **Контрольную группу** составили 10 человек с нормальной массой тела и отсутствием лабораторных признаков нарушений углеводного и липидного обменов, которые по результатам клинико-инструментального обследования эндокринологом были признаны метаболически здоровыми. По среднему возрасту ($52,0 \pm 3,4$ лет; $p > 0,05$) контрольная группа не отличалась от группы метаболически компрометированных лиц основной группы.

Пациентам всех групп проводили антропометрические (масса тела, рост, индекс массы тела (ИМТ), окружность талии (ОТ) и бедер (ОБ)) и лабораторные исследования (биохимические и молекулярно-генетические).

Биохимические исследования

Определяли в сыворотке крови уровни показателей: глюкоза натощак и через 2 часа для перорального глюкозотолерантного теста (ОГТТ), гликированный гемоглобин (HbA1c), общий холестерин (ОХС), триглицериды (ТГ), ХС липопротеинов высокой плотности (ХС ЛПВП), свободных жирных кислот (СЖК) с помощью автоматического биохимического анализатора «Vitalab Flexor XL» (ELITech Group Vital, Франция); рассчитывали концентрацию ХС липопротеинов низкой плотности (ХС ЛПНП), очень низкой плотности (ХС ЛПОНП) и коэффициент атерогенности (КА). Количественное определение инсулина, лептина, адипонектина и высокочувствительного С-реактивного белка (hsCRP) в сыворотке крови проводили методом иммуноферментного анализа (ИФА), используя микропланшетный ридер «Zenith 1100» (Anthos, Австрия) при длине волны 450 нм.

Молекулярно-генетические исследования

Висцеральный жир забирали у пациентов с желчекаменной болезнью при плановых операциях в условиях операционной клиники ФГБОУ ВО Тверской ГМУ МЗ РФ, при полостном или лапароскопическом доступе, в объеме 0,5 см³ и помещали в пробирку типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл с 0,5 мл стабилизирующего реагента «RNAlater RNA Stabilization Reagent» (Qiagen GmbH, Германия). Пробирки помещали в термоконтейнер с хладагентами и транспортировали в клинично-диагностическую лабораторию поликлиники, где хранили в морозильной камере при -80°C.

Венозную кровь забирали в вакуумную пробирку с активатором свертывания «Vacuette» (Greiner Bio-one, Австрия). После взятия пробирку центрифугировали, сыворотку отбирали в пробирку типа «Эппендорф» объемом 2 мл и помещали на хранение в морозильную камеру при -80°C.

Выделение микроРНК из жировой ткани осуществляли колоночным методом хлороформ-экстракции при помощи набора «miRNeasy Mini Kit» (Qiagen GmbH, Германия). Выделение микроРНК из сыворотки крови осуществляли при помощи набора «miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit» (Qiagen GmbH, Германия). Концентрацию выделенной микроРНК измеряли на спектрофотометре «NanoDrop™ Lite» (Thermo Fisher Scientific, США). Реакцию обратной транскрипции (ОТ) проводили при помощи набора «TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit» (Thermo Fisher Scientific, США). Постановку ПЦР осуществляли при помощи набора «TaqMan® Universal PCR Master Mix II (2×), no UNG» (Thermo Fisher Scientific, США) и набора праймеров к исследуемым микроРНК «TaqMan® MicroRNA Assay» (Thermo Fisher Scientific, США) на амплификаторе с детекцией в режиме реального времени «ДТ-Лайт» (ДНК-технология, Россия).

Анализ полученных результатов ПЦР. Анализ результатов ПЦР начинали с визуальной оценки полученных амплификационных кривых. Затем для каждого образца полученные значения Ct — номера амплификационного цикла на котором кривая флуоресценции пересекла пороговое значение — вносили в базу данных, созданную в программе Microsoft® Office® Excel® 2016 (Microsoft Corporation, Tulsa, USA). ПЦР каждого образца проводили трижды, поэтому сначала определяли среднее значение Ct исследуемых микроРНК и RNU6B. Уровень экспрессии в группах сравнения определяли относительно контрольной группы методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [K.J. Livak, 2001]. Согласно расчетам по данному методу уровень экспрессии микроРНК у лиц контрольной группы равен единице. При этом, если среднее значение $2^{-\Delta\Delta Ct}$ микроРНК в исследуемой группе превышало 1, то уровень ее экспрессии кратно выше, чем в контрольной группе. Если среднее

значение $2^{-\Delta\Delta Ct}$ микроРНК в исследуемой группе меньше 1, то уровень ее экспрессии — ниже, чем в контрольной группе.

Статистическая обработка результатов исследования. Результаты представлены в виде среднего арифметического значения и стандартного отклонения ($\bar{X} \pm SD$), медианы, первого и третьего квартилей (Me [Q₁; Q₃]). Для множественного сравнения результатов более, чем в двух группах, достоверность межгрупповых различий определяли по критерию Ньюмена-Кейлса (при нормальном распределении), по критерию Дана (при отклонении распределения от нормального). Различия значений между группами считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. Взаимосвязь между количественными признаками оценивали путем расчета коэффициента корреляции рангов Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что по антропометрическим показателям (вес, ИМТ, ОТ, ОБ, ОТ/ОБ) и степени ожирения метаболически компроментированные пациентки, как в целом, так и подгруппы с и без СД 2 типа, достоверно отличались от метаболически некомпроментированных. Тогда, как достоверных различий по этой группе параметров между подгруппами больных с ожирением не выявлено.

Результаты биохимических исследований женщин, включенных в исследование, показали, что лица контрольной и основной групп, а также подгруппы пациенток с ИР и с СД 2 типа, достоверно различаются между собой по наличию и тяжести метаболических расстройств.

Результаты молекулярно-генетического исследования показали (рисунок 1 и 2), что у метаболически компрометированных женщин уровни экспрессии всех изученных микроРНК, как в висцеральной жировой ткани, так и в сыворотке крови, достоверно повышены по сравнению с лицами контрольной группы, кроме miR-126 и -132. Экспрессия miR-126 у пациенток с ожирением, ассоциированным с инсулинорезистентностью и СД 2 типа, достоверно снижена и в жировой ткани, и в сыворотке крови, а уровень miR-132 — только в сыворотке крови. Между группами больных ожирением с ИР и СД 2 типа статистически значимо различались уровни экспрессии в висцеральном жире всех изученных микроРНК, за исключением miR-375; в сыворотке крови — всех микроРНК, кроме miR-132.

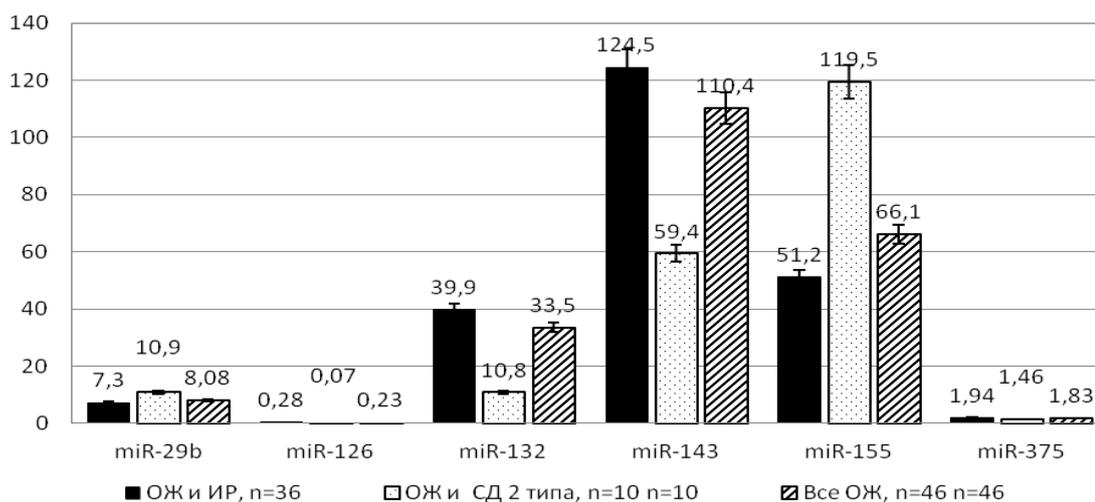


Рисунок 1 — Уровни экспрессии микроРНК ($2^{-\Delta\Delta Ct}$; М — медиана) у метаболически компрометированных пациентов в висцеральном жире

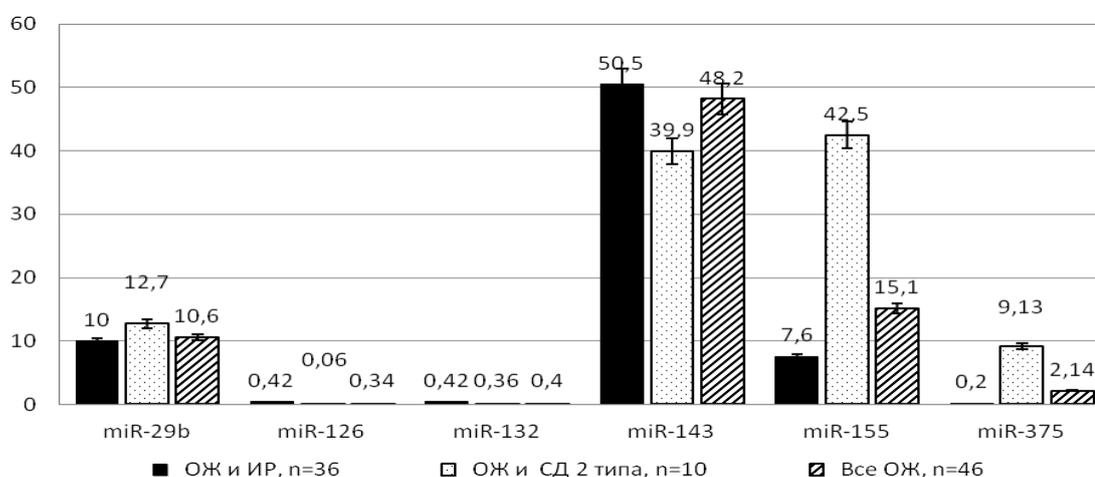


Рисунок 2 — Уровни экспрессии микроРНК ($2^{-\Delta\Delta Ct}$; М — медиана) у метаболически компрометированных пациентов в сыворотке крови

По результатам корреляционного анализа у метаболически компрометированных пациентов выявлено наличие статистически значимых связей между уровнями экспрессии микроРНК в висцеральной жировой ткани, сыворотке крови и показателями: антропометрическими, углеводного и липидного обмена, адипокинами и hsCRP.

Для miR-29b, miR-126 и miR-143 показано наличие корреляции средней силы (r_s соответственно 0,55, 0,46 и 0,52) в отношении между уровнями одноименных микроРНК в висцеральной жировой ткани и сыворотке крови, а для miR-155 — высокой силы, причем для всех больных ожирением и подгрупп с IP и с СД 2 типа (r_s соответственно 0,90, 0,84 и 0,89), что позволяет рассматривать соответствующие микроРНК, как потенциальные лабораторные маркеры.

Согласно информации международных баз данных (miRbase (<http://www.mirbase.org/>), miRTarBase (<https://bio.tools/mirtarbase>), KEGG (Kyoto

Encyclopedia of Genes and Genomes, <https://www.genome.jp/kegg/>) одними из мишеней **miR-29b** являются 3'UTR последовательности (3'- untranslated region, некодирующий участок) мРНК Insig 1, мРНК PGC-1 α и мРНК Akt 2 (рисунок 3).

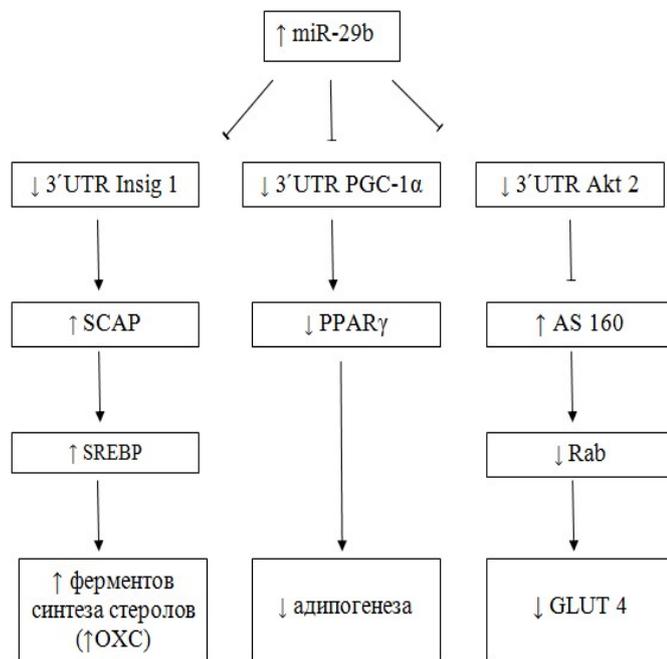


Рисунок 3 — Мишени miR-29b и вовлеченные внутриклеточные сигнальные пути

Взаимодействие miR-29b с мРНК-мишенями приводит к изменению трансляции соответствующих белков и функционирования внутриклеточных сигнальных путей, участниками которых эти белки являются. Так, ингибирование Insig 1 (Insulin induced gene 1) молекулой miR-29b в результате приводит к изменению функционирования внутриклеточного сигнального пути синтеза холестерина, а именно к увеличению экспрессии ферментов метаболического пути синтеза холестерина и, соответственно, повышению его концентрации в организме. Это согласуется с собственными данными о достоверно повышенном уровне ОХС и ХС ЛПОНП и наличии статистически значимой корреляционной связи (r_s) между уровнями miR-29b и ОХС, а также miR-29b и ХС ЛПОНП в жировой ткани и сыворотке крови больных ожирением — 0,43 и 0,3, 0,7 и 0,69 соответственно.

Ингибирование молекулой miR-29b 3'UTR PGC-1 α (Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator 1 α) приводит к снижению уровня PPAR γ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma), транскрипционного фактора, регулирующего дифференцировку адипоцитов. В проведенном исследовании показано, что у метаболически компрометированных больных повышенный уровень miR-29b положительно и выражено коррелировал с концентрацией СЖК в крови, r_s был равен 0,67 и 0,75 соответственно в висцеральной жировой ткани и

сыворотке крови. Указанные обстоятельства позволяют считать miR-29b антиадипогенной.

Взаимодействие miR-29b с 3'UTR мРНК Akt 2 влияет на внутриклеточный сигнальный путь, обеспечивающий перемещение молекул транспортеров глюкозы — GLUT-4 — из цитоплазмы в мембрану клеток инсулинзависимых тканей — мышечной и жировой. miR-29b влияет таким образом, что процесс перемещения GLUT-4 в клеточную мембрану нарушается, следовательно, молекулы глюкозы не могут поступать в клетки мышечной и жировой тканей, что приводит к увеличению концентрации глюкозы в крови. Проведенный корреляционный анализ выявил наличие статистически значимой взаимосвязи повышенного у всех больных ожирением уровня miR-29b в жировой ткани и крови с концентрацией в сыворотке крови глюкозы натощак ($r_s=0,40$ и $r_s=0,47$ ($p<0,05$)) соответственно для miR-29b в висцеральном жире и крови), а также со значением НОМА-IR ($r_s=0,41$ ($p<0,05$) для miR-29b в висцеральном жире).

В связи с этим, miR-29b можно отнести к проинсулинорезистентной и рассматривать данную микроРНК как перспективную для коррекции ИР — как мишень антисмысловых синтетических олигорибонуклеотидов, то есть анти-miR-29b, комплементарных miR-29b. Сравнение направленности изменения уровней miR-29b и их кратности в висцеральной жировой ткани и крови, которые наглядно изображены на рисунках 2 и 3, позволило сделать заключение об однонаправленности и соразмерности таких изменений.

Данное обстоятельство, а также наличие корреляционной связи средней силы ($r_s=0,55$) между уровнями miR-29b в висцеральной жировой ткани и сыворотке крови у метаболически компрометированных, позволяют сделать заключение о перспективности изучения данной микроРНК, как лабораторного маркера инсулинорезистентности.

По информации международных баз данных одной из мишеней **miR-126** является 3'UTR мРНК CCL2 (C-C motif ligand 2) или MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein 1) — цитокина, относящегося к хемокинам (рисунок 4). Снижение уровня miR-126 у больных с ожирением приводит к уменьшению ее ингибирующего действия на воспалительный внутриклеточный каскад, что при переключении на сигнальный путь АМРК (AMP activated protein kinase, АМФ-активируемая протеинкиназа) приводит к повышению уровня PPAR γ , следовательно, стимуляции процесса адипогенеза. В исследовании выявлена отрицательная корреляционная связь средней силы ($r_s=-0,47$ и $r_s=-0,43$) ($p<0,05$) между уровнем экспрессии miR-126 в висцеральной жировой ткани и крови с

концентрацией СЖК в сыворотке крови соответственно. Таким образом, miR-126 можно отнести к микроРНК с проадипогенным действием.

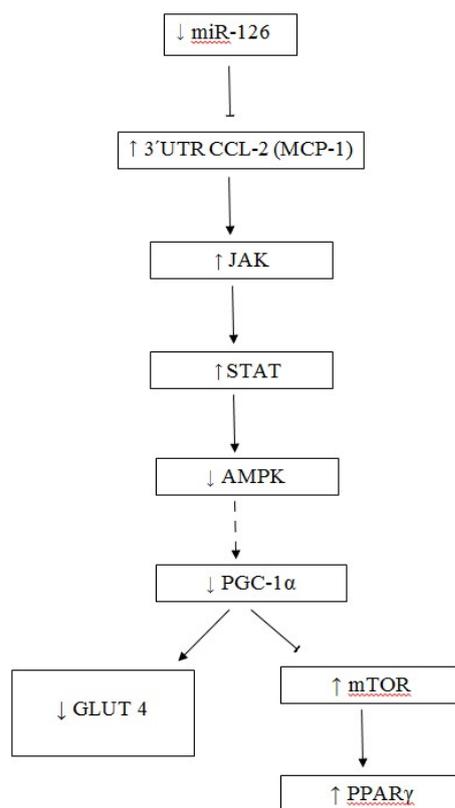


Рисунок 4 — Мишени miR-126 и вовлеченные внутриклеточные сигнальные пути

С другой стороны, при взаимодействии miR-126 с 3'UTR мРНК CCL2 наблюдается снижение экспрессии GLUT-4, что приводит к снижению транспорта глюкозы в клетки мышечной и жировой тканей и к увеличению концентрации глюкозы в крови.

Результаты проведенного лабораторного исследования показали, что снижение уровня miR-126 достоверно коррелирует с маркерами углеводного обмена: r_s между уровнем экспрессии miR-126 в висцеральном жире и концентрацией в сыворотке крови глюкозы натощак, через 2 часа при ОГТТ, гликированного гемоглобина составил -0,72, -0,60, -0,40 соответственно. Содержание miR-126 в крови статистически значимо коррелировало с теми же показателями, кроме гликированного гемоглобина ($r_s=-0,67$ и $r_s=-0,52$). Полученные в исследовании данные согласуются с результатами анализа схем внутриклеточных сигнальных путей и позволяют считать miR-126 проинсулинорезистентной.

Уровень **miR-132** у метаболически компрометированных пациенток по сравнению с метаболически некомпрометированных лицами достоверно повышен в висцеральной жировой ткани, а в сыворотке крови, напротив снижен, причем в крови содержание данной микроРНК, как в целом в группе больных ожирением, так

и в подгруппах находится на одном уровне, а в жировой ткани — на 4 раза выше у пациентов с ИР по сравнению с больными СД 2 типа. Данный факт, а также разнонаправленность изменений уровней miR-132 в жировой ткани и сыворотке крови и отсутствие достоверной корреляции данной микроРНК в этих биоматериалах не позволяют рассматривать miR-132, как перспективную для дальнейшего изучения в качестве лабораторного маркера инсулинорезистентности.

В международных базах данных среди мишеней miR-132 указывается 3'UTR мРНК Sirt 1 (Sirtuins, Silent Information Regulator 1 proteins, SIR2) — фермента из семейства NAD-зависимых белков, обладающих деацетилазной или АДФ-рибозилтрансферазной активностью (рисунок 5).

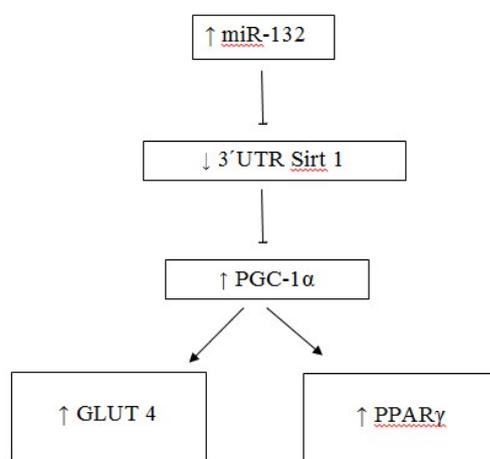


Рисунок 5 — Мишени miR-132 и вовлеченные внутриклеточные сигнальные пути

Повышенный в висцеральной жировой ткани уровень miR-132 приводит к ингибированию мРНК Sirt 1 и, последовательно, трансляции кодируемого ей белка. Сниженное количество этого фермента оказывает слабое ингибирующее действие на PGC-1α, который активирует функционирование PPARγ и GLUT-4. Повышенное содержание этих молекул стимулирует соответственно процессы адипогенеза и поглощения глюкозы клетками мышечной и жировой тканей. Показано наличие достоверной отрицательной корреляции уровня экспрессии miR-132 в висцеральной жировой ткани с концентрацией в сыворотке крови глюкозы натощак, через 2 часа при ОГТТ и СЖК, при этом значения r_s составили -0,49, -0,35 и -0,49 соответственно. Следовательно, логично считать miR-132 проадипогенной и антиинсулинорезистентной, а также рассматривать как перспективную для терапии ИР как таргетированное лекарственное средство.

Высокая кратность повышения уровней **miR-143** у всех больных ожирением, а также у пациентов подгрупп с ИР и СД 2 типа, в висцеральной жировой ткани и крови (рисунки 1 и 2), однонаправленность изменений ее уровней в жировой

ткани и сыворотке крови, а также наличие между этими изменениями корреляционной связи средней силы ($r_s=0,52$ ($p<0,05$)), позволяют сделать заключение о целесообразности исследования данной микроРНК, в качестве лабораторного маркера инсулинорезистентности.

Согласно информации международных баз данных биоинформатики среди мишеней miR-143 имеются 3'UTR мРНК ERK 5 и мРНК Akt (протеинкиназы B) (рисунок 6). У метаболически компрометированных больных взаимодействие значительно увеличенного количества молекул miR-143 с мишенями приводит к выраженному уменьшению количества кодируемых этими мРНК белков.

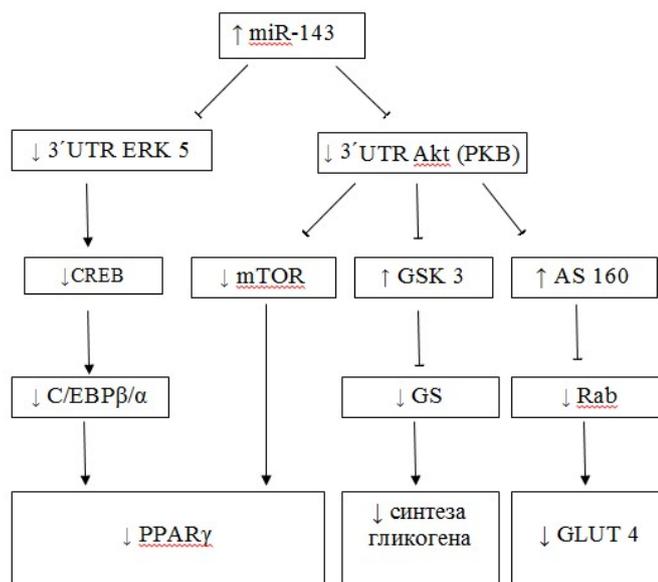


Рисунок 6 — Мишени miR-143 и вовлеченные внутриклеточные сигнальные пути

В свою очередь за счет их регулирующего действия включаются внутриклеточные сигнальные пути: для ERK 5 — через CREB (cAMP response element-binding protein) и для Akt — через mTOR (mammalian target of rapamycin), которые приводят снижению уровня PPAR γ и, следовательно, активности дифференцировки адипоцитов. В проведенном исследовании повышенный уровень miR-143 в висцеральной жировой ткани и крови достоверно коррелировал с концентрацией СЖК в сыворотке крови — $r_s=0,46$ и $r_s=0,47$ ($p<0,05$) у больных с ИР. Сказанное выше о miR-143 дает основание считать данную микроРНК антиадипогенной.

Ингибирование miR-143 мРНК Akt приводит к изменениям в метаболическом пути синтеза гликогена. Повышение уровня GSK (киназы гликогенсинтазы) вызывает активное фосфорилирование гликогенсинтазы, которая в фосфорилированной форме неактивна, следовательно, синтез гликогена тормозится и в крови поддерживается повышенный уровень глюкозы.

К гипергликемии приводит и второй путь, инициированный взаимодействием miR-143 с мРНК Akt, приводящий к уменьшению количества GLUT-4 в мембранах мышечных и жировых клеток.

Результаты проведенного в настоящем исследовании корреляционного анализа выявили наличие достоверной взаимосвязи между уровнем miR-143 в висцеральной жировой ткани, крови и антропометрическими характеристиками — с ИМТ $r_s=0,48$ и $r_s=0,67$ ($p<0,05$) соответственно; с показателями углеводного обмена — между уровнем miR-143 в жировой ткани и концентрацией в сыворотке крови глюкозы натощак, через 2 часа при ОГТТ и индексом инсулинорезистентности Caro — соответственно $r_s=0,38$, $r_s=0,38$ и $r_s=0,36$ ($p<0,05$); уровня miR-143 в крови с лептином в сыворотке крови — $r_s=0,47$ ($p<0,05$). Это подтверждает проведенный выше анализ изменения активности внутриклеточных сигнальных путей у метаболически компрометированных больных и позволяет отнести miR-143 к проинсулинорезистентным и перспективным для изучения применения ее для терапии ИР как терапевтическую мишень.

Полученные в исследовании результаты, а, именно, высокая кратность повышения уровней **miR-155** у всех больных ожирением, а также у пациентов подгрупп с ИР и СД 2 типа, в висцеральной жировой ткани и крови (рисунки 1 и 2), однонаправленность изменений уровней данной микроРНК в обоих исследованных биоматериалах, а также наличие между этими изменениями корреляционной связи высокой силы, дают основание сделать вывод о целесообразности исследования miR-155, в качестве лабораторного маркера инсулинорезистентности, который также может дифференцировать степень ее выраженности, характерную для ИР или СД 2 типа.

Мишенями miR-155 по информации международных баз данных являются 3'UTR мРНК C/EBP β (транскрипционный фактор семейства CCAAT-enhancer-binding proteins), мРНК PP2A и мРНК SOCS 1 (рисунок 7). Взаимодействие miR-155 с указанными выше мишенями приводит к ингибированию трансляции и уровней соответствующих белков, что отражается, в частности, на функционировании внутриклеточных сигнальных путей, ассоциированных с инсулинорезистентностью. Так, вызванное повышением уровня miR-155 снижение количества молекул C/EBP β , приводит к уменьшению содержания адипогенных транскрипционных факторов C/EBP α и PPAR γ , и, следовательно, тормозит процесс адипогенеза. Корреляционный анализ выявил наличие достоверной взаимосвязи между уровнями miR-155 в висцеральной жировой ткани и крови с концентрацией СЖК в сыворотке крови —

$r_s=0,53$ и $r_s=0,52$ ($p<0,05$) соответственно. Данные обстоятельства позволили нам отнести miR-155 к антиадипогенным.

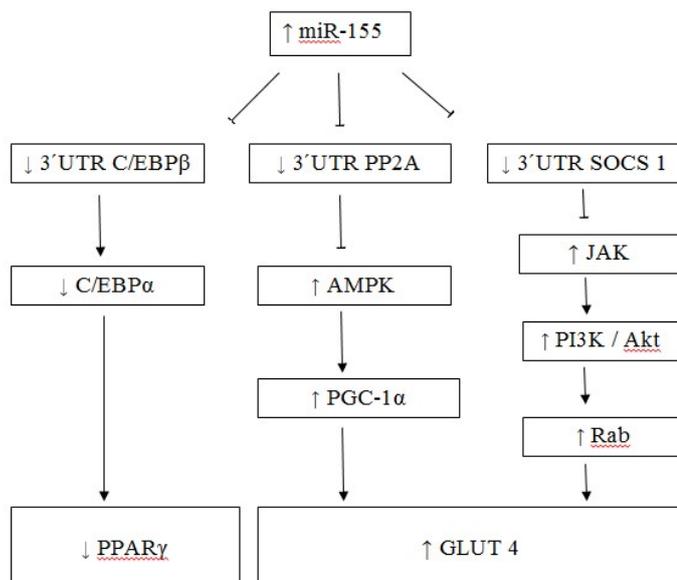


Рисунок 7 — Мишени miR-155 и вовлеченные внутриклеточные сигнальные пути

У метаболически компрометированных больных уменьшение количества молекул PP2A и SOCS 1, за счет взаимодействия повышенного числа молекул miR-155 с соответствующими мРНК, через внутриклеточные сигнальные пути AMPK и JAK/STAT–PI3K/Akt вызывает увеличение количества GLUT-4 в мембранах мышечных и жировых клеток.

Это приводит к активному транспорту глюкозы в клетки и снижению уровня гликемии. В проведенном исследовании расчет корреляционных связей выявил наличие отрицательной связи средней силы между уровнем miR-155 в висцеральном жире и крови с показателями углеводного обмена в сыворотке крови — с концентрацией глюкозы натощак, через 2 часа при ОГТТ — $r_s=-0,67$ и $r_s=-0,82$, $r_s=-0,61$ и $r_s=-0,74$ (все $p<0,05$). Таким образом, полученные в исследовании результаты согласуются с данными анализа схем внутриклеточных сигнальных путей и позволяют считать miR-155 протективной, антиинсулино-резистентной микроРНК и целесообразным изучение ее применения для терапии ИР как таргетированное лекарственное средство.

Мишенями **miR-375** по информации международных баз данных являются 3'UTR мРНК ERK 1/2 и мРНК AdipoR (Adiponectin receptor) (рисунок 8). Ингибирование мРНК ERK 1/2, вызванное взаимодействием с miR-375, приводит к увеличению уровня PPAR γ , и, следовательно, активному протеканию адипогенеза. Ранговый коэффициент корреляции Спирмена между содержанием miR-375 в крови и концентрацией СЖК в сыворотке крови, рассчитанный в данном исследовании,

составил $-0,42$ ($p < 0,05$). В этом контексте miR-375 можно отнести к проадипогенным.

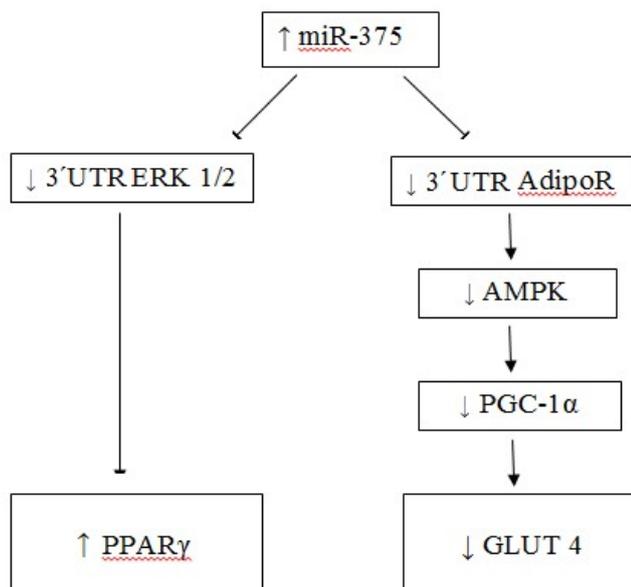


Рисунок 8 — Мишени miR-375 и вовлеченные внутриклеточные сигнальные пути

Взаимодействие miR-375 с мРНК AdipoR, приводит к пониженной экспрессии последнего. В проведенном исследовании у больных ожирением и СД 2 типа была выявлена отрицательная корреляционная связь средней силы ($r_s = -0,74$ ($p < 0,05$)) между уровнем miR-375 в висцеральной жировой ткани и концентрацией адипонектина в сыворотке крови больных СД 2 типа, а также достоверная обратная корреляционная связь слабой силы ($r_s = -0,39$ ($p < 0,05$)) между уровнями miR-375 и адипонектина в сыворотке крови всех метаболически компрометированных пациентов.

Понижение уровня AdipoR через внутриклеточный сигнальный путь AMPK вызывает уменьшение количества транспортеров глюкозы GLUT 4 в мембранах жировых и мышечных клеток, что приводит к снижению транспорта в них глюкозы, соответственно, вносит свой вклад в формирование гипергликемии. Проведенный в исследовании корреляционный анализ выявил наличие положительной корреляционной связи средней силы между уровнем miR-375 в сыворотке крови с показателями углеводного обмена — с концентрацией глюкозы натощак, через 2 часа при ОГТТ, гликированного гемоглобина в сыворотке крови — $r_s = 0,69$, $r_s = 0,54$ и $r_s = 0,52$ ($p < 0,05$) соответственно. Следовательно, в этом плане miR-375 можно назвать проинсулинорезистентной. Однако, представляется не целесообразным

использовать miR-375 для коррекции ИР в качестве терапевтической мишени в виду незначительного повышения ее уровней и в висцеральной жировой ткани, и в крови.

Разнонаправленность изменений, а также низкая кратность как повышения, так и понижения уровня miR-375 у больных ожирением не позволяют рассматривать эту микроРНК, как лабораторный маркер инсулинорезистентности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, результаты проведенного исследования позволяют оценить роль miR-29b, -126, -132, -143 и -155 и -375 в адипогенезе и инсулинорезистентности (таблица 1).

Таблица 1 — Ассоциация экспрессии микроРНК с процессами адипогенеза и инсулинорезистентности и перспективы их практического применения

Микро-РНК	Адипогенез	Инсулинорезистентность	Практическое применение
miR-29b	Анти-адипогенная	Проинсулинорезистентная	- лабораторный маркер - для терапии ИР как терапевтическая мишень
miR-126	Про-адипогенная	Проинсулинорезистентная	—
miR-132	Про-адипогенная	Антиинсулинорезистентная	- для терапии ИР как таргетированное лекарственное средство
miR-143	Анти-адипогенная	Проинсулинорезистентная	- лабораторный маркер - для терапии ИР как терапевтическая мишень
miR-155	Анти-адипогенная	Антиинсулинорезистентная	- лабораторный маркер - для терапии ИР как таргетированное лекарственное средство
miR-375	Про-адипогенная	Проинсулинорезистентная	—

Полученные данные дают основание определить перспективы дальнейшего практического применения изученных микроРНК.

ВЫВОДЫ

1. У больных алиментарно-конституциональным ожирением в висцеральной жировой ткани уровни экспрессии miR-29b, -132 -143, -155, -375 статистически значимо повышены, а уровень miR-126 — достоверно снижен по сравнению с метаболически некомпromетированными лицами.

2. У больных алиментарно-конституциональным ожирением в сыворотке крови содержание miR-29b, -143, -155, -375 достоверно повышено, а miR-126 и

miR-132 — статистически значимо снижено по сравнению с метаболически некомпрометированными лицами.

3. У больных алиментарно-конституциональным ожирением и инсулинорезистентностью уровень miR-126 достоверно снижен, а miR-29b, -143 и -155 — достоверно повышен как в сыворотке крови, так и в висцеральной жировой ткани. miR-132, и -375 экспрессированы разнонаправлено: в висцеральной жировой ткани их уровни статистически значимо повышены, а в крови — снижены.

4. У больных алиментарно-конституциональным ожирением и СД 2 типа уровень miR-29b, miR-143, miR-155, miR-375 достоверно повышен, а miR-126 достоверно снижен как в сыворотке крови, так и в висцеральной жировой ткани. Содержание miR-132 статистически значимо повышено в жире и снижено в крови.

5. Выявлено наличие корреляционной связи средней силы между уровнями микроРНК в висцеральной жировой ткани и сыворотке крови с показателями углеводного обмена — с концентрацией глюкозы натощак, через 2 часа при ОГТТ, гликированного гемоглобина в сыворотке крови: отрицательной — у miR-126, -132 и -155, положительной — у miR-375; при этом содержание miR-29b и -143 также положительно коррелировало с концентрацией глюкозы натощак и индексом инсулинорезистентности НОМА-IR.

6. Выявлено наличие корреляционной связи средней силы между уровнями микроРНК в висцеральной жировой ткани и сыворотке крови с показателями липидного обмена — с ТГ, ОХС и СЖК в сыворотке крови: положительной — у miR-29b, -143 и -155, отрицательной — у miR-126, -132 и -375.

7. Изученные микроРНК ассоциированы с адипогенезом: проадипогенные — miR-126, -132 и -375, антиадипогенные — miR-29b, -143 и -155.

8. Изученные микроРНК ассоциированы с инсулинорезистентностью: проинсулинорезистентные — miR-29b, -126, -143 и -375, антиинсулинорезистентные — miR-132 и -155.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. МикроРНК-29b, -143 и, особенно -155, перспективны для изучения у больных алиментарно-конституциональным ожирением в качестве лабораторного маркера инсулинорезистентности.

2. МикроРНК-29b и -143 являются кандидатами для исследования в качестве терапевтической мишени для коррекции инсулинорезистентности у больных алиментарно-конституциональным ожирением.

3. МикроРНК-132 и -155 перспективны для изучения у больных алиментарно-конституциональным ожирением для коррекции инсулинорезистентности как таргетированное лекарственное средство.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Тофило, М.А. МикроРНК, регулирующие развитие инсулинорезистентности / М.А. Тофило, Е.Н. Егорова // Материалы IV межвузовской научно-практической конференции молодых учёных с международным участием «Молодежь и медицинская наука». — Тверь : Ред.-изд. центр Твер. гос. мед. ун-та, 2016. — С. 172-175.
2. Тофило, М.А. МикроРНК — биомаркеры в системе персонализированной медицины при инсулинорезистентности и методы их определения / М.А. Тофило, Е.Н. Егорова, М.Н. Калинин, Н.Е. Щеглова // Верхневолжский медицинский журнал. — 2017. — № 3. — С. 35-39.
3. Тофило, М.А. МикроРНК, регулирующие адипогенез при сахарном диабете 2 типа / М.А. Тофило, Е.Н. Егорова // Здоровье и образование в XXI веке. — 2017. — Т. 17. — № 3. — С. 35-39.
4. Тофило, М.А. Экспрессия микроРНК, ассоциированных с адипогенезом, в жировой ткани при абдоминально-конституциональном ожирении и инсулинорезистентности / М.А. Тофило, Е.Н. Егорова, М.А. Горшкова // Материалы научно-практических конференции в рамках V Российского конгресса лабораторной медицины (РКЛМ 2019). — М. : ИПО «У Никитских ворот», 2019. — С. 252-253.
5. Тофило, М.А. Особенности экспрессии микроРНК-143 и микроРНК-155 у больных с ожирением и инсулинорезистентностью / М. А. Тофило, Е. Н. Егорова // Вестник биомедицины и социологии. — 2019. — Т. 4. — № 3. — С. 7-10.
6. Тофило, М.А. МикроРНК, ассоциированные с воспалением, в патогенезе абдоминально-конституционального ожирения / М.А. Тофило, Е.Н. Егорова, М.А. Горшкова // Материалы VII Всероссийской межвузовской научно-практической конференции молодых ученых с международным участием «Молодежь и медицинская наука». — Тверь : Ред.-изд. центр Твер. гос. мед. ун-та, 2020. — С.589-593.
7. Тофило, М.А. Уровни экспрессии микроРНК -126, -143, -155 в жировой ткани и сыворотке крови и их корреляция с биохимическими показателями у женщин с ожирением и инсулинорезистентностью / М.А. Тофило // Современные проблемы науки и образования. — 2020. — № 2. DOI: 10.17513/spno.29595
8. Тофило, М.А. Патогенетическое значение ассоциированных с адипогенезом микроРНК в развитии инсулинорезистентности при алиментарно-конституциональном ожирении / М.А. Тофило // Тверской медицинский журнал. — 2020. — №2. — С. 52-58.
9. Тофило, М.А. Взаимосвязь экспрессии микроРНК и биохимических показателей у женщин с ожирением и инсулинорезистентностью / М.А. Тофило,

Е.Н. Егорова // Материалы XXVI Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины - 2020», Санкт-Петербург, 2020. — С. 182-183.

10. Тофило, М.А. Расчет экспрессии микроРНК, ассоциированных с ожирением и инсулинорезистентностью / М.А. Тофило, Е.Н. Егорова // Лабораторная служба. — 2020. — Том 9. - № 1. — С. 63 DOI:[10.17116/labs202090119](https://doi.org/10.17116/labs202090119)

11. Тофило, М.А. Взаимосвязь экспрессии микроРНК-29b, -132, -375 в жировой ткани и сыворотке крови с показателями углеводного и липидного обменов у женщин с ожирением и инсулинорезистентностью / М.А. Тофило, Е.Н. Егорова, М.Б. Лясникова, Н.А. Белякова // Вестник новых медицинских технологий. Электронное периодическое издание. — 2020. № 4. Публикация 1-5. DOI: [10.24411/2075-4094-2020-16674](https://doi.org/10.24411/2075-4094-2020-16674)

12. Роль микроРНК в развитии инсулинорезистентности и её последствий у женщин с ожирением / М.А Тофило [и др.] // Тверской медицинский журнал. — 2021. — №1. — С. 164-170. <http://tvermedjournal.tvergma.ru/930/1/27.pdf>

Тофило, М.А. Биохимические показатели и экспрессия микроРНК в жировой ткани и в крови у пациентов с инсулинорезистентностью и ожирением и здоровых лиц» / М.А. Тофило, Е.Н. Егорова, М.Б. Лясникова, М.А. Горшкова, Н.А. Белякова, А.Н. Маслов // Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 20200620016 от 09.01.2020 г.