

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Тверской государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
(ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России)

На правах рукописи

ТОФИЛО МАРИЯ АЛЕКСАНДРОВНА

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

14.03.03 — Патологическая физиология

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

д. м. н., доцент Егорова Елена Николаевна

Тверь — 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
Глава 1. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ПАТОГЕНЕЗЕ ИНСУЛИНОРЕЗИСТЕНТНОСТИ ПРИ ОЖИРЕНИИ (обзор литературы)	17
1.1. Классификации и критерии ожирения	17
1.2. Критерии инсулинорезистентности	19
1.3. Патогенез инсулинорезистентности при алиментарно- конституциональном ожирении	20
1.4. Факторы, регулирующие функционирование жировой ткани.....	23
1.4.1. Адипокины	24
1.4.2. МикроРНК	26
1.4.3. МикроРНК, ассоциированные с адипогенезом и чувствительностью к инсулину	28
1.4.3.1. МикроРНК 29	28
1.4.3.2. МикроРНК 126	34
1.4.3.3. МикроРНК 132	39
1.4.3.4. МикроРНК 143	43
1.4.3.5. МикроРНК 155	50
1.4.3.6. МикроРНК 375	54
Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	59
2.1. Дизайн исследования	59
2.2. Характеристика обследованных групп	60
2.3. Антропометрические исследования	61
2.4. Лабораторные исследования	61
2.4.1. Получение материала для биохимических исследований	61
2.4.2. Биохимические исследования	62
2.5. Молекулярно-генетические исследования	67

2.6. Методы статистического анализа	70
Глава 3. КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫЕ ПРОЯВЛЕНИЯ АЛИМЕНТАРНО-КОНСТИТУЦИОНАЛЬНОГО ОЖИРЕНИЯ И ИНСУЛИНОРЕЗИСТЕНТНОСТИ У ОБСЛЕДОВАННЫХ ЖЕНЩИН	73
3.1. Характеристика обследованных женщин по возрасту и антропометрическим показателям	73
3.2. Характеристика показателей углеводного обмена	75
3.3. Характеристика показателей липидного обмена	79
3.4. Уровни адипокинов и С-реактивного белка	81
Глава 4. ЭКСПРЕССИЯ микроРНК, АССОЦИИРОВАННЫХ С АДИПОГЕНЕЗОМ У БОЛЬНЫХ АЛИМЕНТАРНО- КОНСТИТУЦИОНАЛЬНЫМ ОЖИРЕНИЕМ	83
Глава 5. ВЗАИМОСВЯЗЬ ЭКСПРЕССИИ АССОЦИИРОВАННЫХ С АДИПОГЕНЕЗОМ микроРНК С АНТРОПОМЕТРИЧЕСКИМИ И БИОХИМИЧЕСКИМИ ПОКАЗАТЕЛЯМИ БОЛЬНЫХ АЛИМЕНТАРНО-КОНСТИТУЦИОНАЛЬНЫМ ОЖИРЕНИЕМ.....	92
5.1. Корреляция уровней микроРНК с антропометрическими и биохимическими показателями пациентов с алиментарно- конституциональным ожирением	92
5.2. Корреляция уровней одноименных микроРНК в висцеральной жировой ткани и сыворотке крови пациентов с алиментарно- конституциональным ожирением	98
Глава 6. РОЛЬ АССОЦИИРОВАННЫХ С АДИПОГЕНЕЗОМ микроРНК В ПАТОГЕНЕЗЕ ИНСУЛИНОРЕЗИСТЕНТНОСТИ ПРИ АЛИМЕНТАРНО-КОНСТИТУЦИОНАЛЬНОМ ОЖИРЕНИИ (обсуждение результатов исследования)	100
ВЫВОДЫ	120
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	122

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	123
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	125

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Ожирение – одна из глобальных медицинских и социальных проблем XXI века. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) называет ожирение неинфекционной эпидемией XXI века, которая поразила в мире более 670 миллиона человек [95], в России ожирением и избыточным весом страдают 20-54% населения [1, 13]. Несмотря на меры, предпринимаемые органами здравоохранения многих стран в рамках Европейской хартии по борьбе с ожирением (2006), Плану действий по профилактике и борьбе с неинфекционными заболеваниями в Европейском регионе ВОЗ в 2016-2025 г.г. и другим документам, распространенность ожирения продолжает расти «пугающими» темпами [260].

Значимость проблемы ожирения связана с тем, что оно провоцирует комплекс психологических, социальных и медицинских неблагоприятных последствий, таких как сердечно-сосудистые заболевания, онкологическая патология, сахарный диабет и другие [6]. Учитывая актуальность проблемы, ожирение, как самостоятельная нозологическая единица, включена в Международную статистическую классификацию болезней и проблем, связанных со здоровьем (МКБ-10) под кодом E66.0, для которой разработаны стандарты первичной медико-социальной и специализированной медицинской помощи взрослому населению и детям [11].

Ожирение (ОЖ) является обязательным условием для развития метаболического синдрома (МС), который представляет собой совокупность метаболических, гормональных и клинических нарушений, являющихся факторами высокого риска развития сердечно-сосудистых заболеваний [12]. Согласно «Рекомендациям экспертов Всероссийского научного общества кардиологов по диагностике и лечению метаболического синдрома» (2013) МС характеризуется увеличением массы висцерального жира, снижением чувствительности периферических тканей к инсулину и гиперинсулинемией,

которые вызывают развитие нарушений углеводного, липидного, пуринового обменов, а также артериальной гипертензией [15]. Доказано, что основным механизмом развития метаболического синдрома 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% [1, 6, 9, 13].

Для понимания патогенетических механизмов формирования МС с целью обоснования патогенетической профилактики и лечения его осложнений были проведены многочисленные биохимические, иммунологические, генетические исследования [132, 144, 145, 150]. 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* [124]. Затем, начиная с 2000 года, сотрудниками лаборатории G. Ruvkun, а в последствии другими исследователями, 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 [166, 258] и патогенеза широкого круга заболеваний – сердечно-сосудистых, печени, почек, легких, опухолей [42, 142, 200, 244]. На рубеже веков появились и первые публикации о результатах исследований связи экспрессии различных микроРНК с развитием ожирения и инсулинорезистентности, первой из таких микроРНК стали представители семейства let-7 [67, 253]. В настоящее

время происходит накопление информации о связи изменения экспрессии определенных микроРНК с развитием конкретных заболеваний.

Активный научный поиск, ориентированный на микроРНК, экспрессия которых ассоциирована с чувствительностью к глюкозе, метаболизмом липидов и ожирением [112, 155] 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 [16, 73]. Кроме этого, благодаря развитию фармацевтической химии появилась возможность использования для терапии инсулинорезистентности искусственно синтезированных олигорибонуклеотидных последовательностей микроРНК и их антагонистов (анти-микроРНК) [165, 257].

Учитывая изложенное выше, представляется актуальным изучение изменения экспрессии микроРНК, ассоциированных с адипогенезом, при ожирении и инсулинорезистентности, а также взаимосвязей между их экспрессией и гликемическим статусом, уровнем чувствительности к инсулину, липидным спектром для выявления перспективных для дальнейшего исследования микроРНК, как лабораторных биомаркеров и терапевтических средств.

Степень разработанности темы исследования

Исследование регулирующей функции микроРНК у человека и животных на гомеостаз глюкозы началось в первые годы XXI века. Было показано, что экспрессия микроРНК семейства let-7 повышена у трансгенных мышей с моделированной инсулинорезистентностью в скелетных мышцах и печени [238], у больных сахарным диабетом 2 типа — в мышцах и поджелудочной железе [37]. Вероятными мишенями для микроРНК

семейства let-7, как регуляторов метаболизма глюкозы и инсулинорезистентности были определены рецепторы инсулина, IGF1, IRS-2. Экспериментальными исследованиями установлено, что применение anti-miR let-7 улучшало показатели чувствительности к инсулину и снижало накопление триацилглицеролов в печени мышей путем anti-let-7 опосредованной дерепрессии рецепторов инсулина [92].

На протяжении предыдущих двадцати лет проводились многочисленные исследования по определению у пациентов с ожирением и инсулинорезистентностью изменений экспрессии микроРНК, как циркулирующих в крови, так и в тканях — поджелудочной железе, печени, скелетной мускулатуре и жировой ткани. Для установления мишеней микроРНК применялись адекватные модели лабораторных животных (*ob/ob*, *db/db*, DIO, *LepRdb/db*, Zucker fatty rats, Zucker Diabetic Fatty rats,) и культуры клеток (линии 3T3-L1, 3T3-F442A, Ob17) [129, 138, 143, 145]. К настоящему времени для некоторых микроРНК, таких как miR-27a, -130a, 146b, let-7, однозначно установлен про- и/или антиадипогенный регуляторный эффект, влияние на компоненты сигнальных путей, контролирующих чувствительность к инсулину [238].

В то же время имеется обширный список микроРНК-кандидатов, вероятных регуляторов процессов адипонегеза и инсулинорезистентности [132], но для которых требуется уточнение уровней экспрессии в крови, в инсулинозависимых тканях, печени и поджелудочной железе, а также их взаимосвязей с показателями углеводного и липидного метаболизма. Среди таких микроРНК – miR-29b, -126, -132, -143, -155 и -375, являющиеся объектами настоящего исследования.

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 Тверского 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 результатов исследования

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. Пациентам основной группы и группы сравнения проводили клиническое и лабораторное обследование, включающее биохимические и молекулярно-генетические методы исследования. 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 в соответствии с целью и задачами, использованием высоко чувствительных и специфичных наборов реактивов для лабораторных исследований, современным сертифицированным лабораторного оборудования, хранением полученных в настоящем исследовании результатов в компьютерной базе данных в программе Microsoft® Office® Excel® 2016, использованием адекватных методик статистической обработки данных исследования с помощью IBM® SPSS® Statistics 23.0, публикацией в рецензируемых научных журналах результатов исследования и их апробацией на многочисленных научных конференциях. Первичная документация результатов проведенного

исследования проверена комиссией (акт проверки первичной научной документации от 11.03.2020).

Апробация материалов работы

Результаты исследования в виде устных или стендовых докладов представлены на 5 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 21 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 с курсом теории и практики сестринского дела, 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 03 июня 2021 года, протокол № 1.

Внедрение результатов исследования

Результаты исследования используются в учебном процессе на кафедре патологической физиологии, кафедре 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 клинко-диагностической лаборатории поликлиники ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России.

Личный вклад автора в проведенное исследование

Автор приняла активное участие в формулировке цели и постановке задач исследования. Лично автором выполнены набор фактического материала для исследования и его обработка, 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 по результатам проведенного исследования, подготовлены статьи для публикации, презентации и стендовые доклады для выступления на конференциях.

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.

1. Тофило, М.А. МикроРНК, регулирующие развитие инсулинорезистентности. /М.А. Тофило, Е.Н. Егорова// Молодежь и медицинская наука, материалы IV межвузовской научно-практической конференции молодых учёных с международным участием. – Тверь, 2016. – С. 172-175.

2. Тофило, М.А. МикроРНК – биомаркеры в системе персонализированной медицины про 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 конференций в рамках V Российского конгресса лабораторной медицины (РКЛМ 2019) : сборник тезисов. – 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 // Молодежь и медицинская наука: материалы VII Всероссийской межвузовской научно-практической конференции

молодых ученых с международным участием (5 декабря 2019 г.). – 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

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.

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 источник, из них 16 отечественных и 250 зарубежных авторов. Диссертационная работа содержит 19 таблиц и иллюстрирована 10 рисунками.

Выражаю искреннюю благодарность и глубокую признательность оказавшей мне неоценимую помощь в клиническом обследовании пациентов для адекватного деления обследованных пациентов на группы доценту кафедры эндокринологии к.м.н. М.Б. Лясниковой.

Глава 1

СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ПАТОГЕНЕЗЕ ИНСУЛИНОРЕЗИСТЕНТНОСТИ ПРИ ОЖИРЕНИИ

(Обзор литературы)

1.1. Классификации и критерии ожирения

Ожирение – это хроническое заболевание, характеризующееся избыточным накоплением жировой ткани в организме, представляющим угрозу здоровью, и являющееся основным фактором риска ряда других хронических заболеваний, включая сахарный диабет 2 типа (СД 2 типа) и сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) [260]. Согласно международной классификации болезней (МКБ-10), выделяют следующие виды ожирения: 1) ожирение, обусловленное избыточным поступлением энергетических ресурсов; 2) ожирение, вызванное приемом лекарственных средств; 3) крайняя степень ожирения с альвеолярной гиповентиляцией (синдром гиповентиляции при ожирении (Obesity hypoventilation syndrome [OHS]), пикквикский синдром); 4) другие формы ожирения и болезненное ожирение; 5) неуточненное ожирение [11]. Данная классификация является стандартом для организации здравоохранения, эпидемиологии, медицины, а также анализа общего состояния здоровья населения.

Согласно этиологическому принципу ожирение классифицируется на первичное (экзогенно-конституциональное, алиментарно-конституциональное) ожирение и вторичное (симптоматическое) ожирение, в структуре которого выделяют: 1) ожирение с установленным генетическим дефектом (в том числе в составе известных генетических синдромов с полиорганным поражением) 2) церебральное ожирение (адипозогенное ожирение, синдром Пехкранца-Бабинского-Фрелиха) вследствие опухолей головного мозга, диссеминации системных поражений и инфекционных заболеваний, психических заболеваний 3) ожирение вследствие

эндокринопатий: заболеваний гипоталамо-гипофизарной системы, надпочечников, гипотиреозное, гипоовариальное, 4) ятрогенное ожирение на фоне приема лекарственных препаратов, способствующих увеличению массы тела [5].

Всемирной организацией здравоохранения была принята классификация ожирения по индексу массы тела (ИМТ), который рассчитывается как отношение массы тела в килограммах и величины роста человека в метрах, возведенной в квадрат. Величина ИМТ более 25 кг/м² свидетельствует о наличии избыточной массы тела, более 30 кг/м² – ожирения. Причем, ИМТ от 30,00 до 34,99 кг/м² соответствует первой степени ожирения, от 35 до 39,99 кг/м² – второй, 40 кг/м² и более – третьей. Следует отметить, что между ИМТ и рисками заболеваемости и смертности существует прямая зависимость [12]. Данная классификация является общепринятой и применяется в практической медицине, однако она не учитывает количество жировой ткани в организме.

Важными показателями развития ожирения является распределение жира. Ожирение можно классифицировать как абдоминальное (центральное, андронидное), когда основная масса жира расположена в брюшной полости, на передней брюшной стенке шеи и лице, или как гиноидное – с преимущественным отложением жира в области бедер и таза. Для оценки количества и распределения жира необходимо дополнительное измерение окружности талии, либо определения отношения окружности талии к окружности бедер. Для диагностики абдоминального (висцерального) ожирения рекомендуется измерение окружности талии: окружность талии (ОТ) 94 см и более у мужчин, 80 см и более у женщин является диагностическим критерием абдоминального ожирения [260]. Также, центральное ожирение диагностируется по индексу отношения окружности талии и бедер, если он превышает 0,8 для женщин или 0,95 у мужчин [259].

1.2. Критерии инсулинорезистентности

Для диагностики инсулинорезистентности в настоящее время существует около десяти различных методов. Среди них выделяют прямые и непрямые методы оценки. Золотым стандартом диагностики инсулинорезистентности считается эугликемический гиперинсулинемический клэмп-тест – наиболее информативный прямой метод диагностики, обладающий высоким уровнем чувствительности и специфичности. Суть метода заключается в увеличении концентрации инсулина в крови путем инфузии инсулина со скоростью 1 МЕ/мин на 1 кг массы тела и одновременном внутривенном введении глюкозы для поддержания уровня гликемии около 5,5 ммоль/л. Количество вводимой глюкозы, необходимое для поддержания указанного уровня гликемии, будет отражать ее инсулинообусловленный метаболизм в тканях. Соответственно, чем больше выражена ИР, тем меньше глюкозы понадобится. Однако данный метод достаточно трудоемок, связан с необходимостью инфузии экзогенного инсулина и сложно выполним в повседневной клинической практике [131].

Широкое применение в клинической практике получили косвенные методы оценки ИР с использованием специальных расчетных индексов, основанных на соотношении концентраций глюкозы и инсулина как натощак, так и через 2 ч после нагрузки при проведении перорального глюкозотолерантного теста. Один из них - индекс Caro – отношение глюкозы (в ммоль/л) к инсулину (в мкМЕ/мл) в плазме крови натощак. Количественным критерием является значение 0,33. Значения Caro ниже 0,33 свидетельствуют об инсулинорезистентности. В нашей стране наиболее часто используется индекс НОМА-IR (homeostasis model assessment), предложенный в 1985 г. [100]: уровень инсулина натощак (мкЕд/л) умноженный на уровень глюкозы плазмы натощак (ммоль/л) и поделенный на 22,5. Уровень индекса НОМА-IR более 2,7 свидетельствует о наличии ИР. Четких критериев интерпретации НОМА-IR нет, в исследованиях можно

встретить разные показатели отрезной точки (75 перцентиль кумулятивного популяционного распределения), но всегда следует учитывать – чем выше данный индекс, тем более выражена ИР.

Еще один индекс ИР основан на показателях липидного спектра – уровень триглицеридов (ТГ) (мг/дл) / уровень холестерина липопротеидов высокой плотности (ХС-ЛПВП) (мг/дл). При использовании указанных единиц измерения расчетный индекс более 3,5 свидетельствует о наличии ИР. Вышеперечисленные математические модели широко применяются в практике, однако, в силу своей вариабельности, не могут быть использованы для рутинного скрининга. В последние годы активно изучаются новые подходы к определению ИР. В частности, в 2007 г. был предложен индекс ИР с участием адипонектина (НОМА-AD) – соотношение НОМА-IR и уровня адипонектина. В качестве порогового значения, свидетельствующего об ИР, принято считать уровень НОМА-AD более 0,95 [236]. В 2014 г. опубликованы данные о применении нового метаболического индекса (МИ) для определения ИР, где учтены не только показатели углеводного обмена, но и уровень ТГ и ХС-ЛПВП натошак. $MI = TG \text{ (ммоль/л)} \times \text{глюкоза (ммоль/л)} / \text{ХС-ЛПВП (ммоль/л)}$. ИР диагностируется при уровне МИ 7,0 и более [2].

1.3. Патогенез инсулинорезистентности при алиментарно-конституциональном ожирении

Установлено, что инсулинорезистентность возникает, когда инсулин-чувствительные ткани: скелетные мышцы, жировая ткань и печень теряют способность адекватно реагировать на инсулин. Передача сигналов инсулина регулирует обмен практически во всех тканях и влияет как на метаболизм глюкозы, так и на рост и пролиферацию клеток. Сигнальные пути действия инсулина включают сложные взаимодействия различных гормонов,

нейропептидов и других сигнальных молекул, которые изменяются в зависимости от потребления пищи и расхода энергии [12].

Передача сигналов инсулина включает 3 основных пути: субстрат рецептора инсулина/фосфатидилинозит-3-киназный путь (IRS/PI3K), киназный путь митоген-активированный белка (Ras/MAPK) и цАМФ/убиквитиновый путь (CAP/Cbl) путь [186]. Тем не менее, только путь IRS/PI3-киназа опосредует метаболические действия инсулина, по этому каскаду большая часть передачи сигналов инсулина осуществляется опосредовано фосфорилированием тирозина семейства белков инсулинового рецептора IRS, которые затем взаимодействуют с различными эффекторными белками, включая PI3-киназу и другими (рисунок 1). Инсулиновый рецептор представляет собой тетрамер, состоящий из двух внеклеточных α -субъединиц и двух трансмембранных β -субъединиц. α -субъединицы проявляют сродство к инсулину, а β -субъединицам свойственна тирозинкиназная активность. Инсулин связывается с α -субъединицей, что вызывает конформационные изменения и активацию β -субъединицы с последующим фосфорилированием рецептора инсулина по остаткам тирозина. После активации инсулинового рецептора происходит его связывание с внутриклеточными белками, в частности, с субстратами инсулинового рецептора 1 и 2 (IRS-1 и IRS-2) [48]. Связывание субъединицы p85 с фосфорилированным остатком тирозина IRS приводит к активации каталитической активности субъединицы p110 с последующим увеличением содержания фосфатидилинозитол-3,4-бисфосфата (PIP2) и фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфата (PIP3). Далее в сигнальном пути PI-3K принимают участие несколько киназ серин/треонинового типа (PDK-1, Akt, p70S6 K, GSK-3). Киназы участвуют в реализации таких важных биологических эффектов инсулина, как перемещение транспортера глюкозы-4 (Glucose transporter type 4, GLUT-4) из внутриклеточных везикул на

протеинкиназами других сигнальных путей: 5'AMP-активируемой протеинкиназой (АМПК), протеинкиназой С (РКС), с-Jun-NH₂-концевой протеинкиназой (JNK), киназой β ингибитора каппа В (IKK β , Inhibitor of κ B kinase β) может осуществляться по многим серин/треониновым остаткам. Такое фосфорилирование ингибирует функцию IRS-1, способствуя его деградации, ослаблению взаимодействия с инсулиновым рецептором или ассоциации с SH₂-доменами. В роли активаторов вышеперечисленных протеинкиназ могут выступать провоспалительные цитокины: фактор некроза опухолей α (TNF- α), интерлейкины (IL-1 β , IL-6), активные формы кислорода (АФК), свободные жирные кислоты (СЖК), лептин, адипонектин, эндотелин-1 и другие метаболиты ЖТ, что приводит к нарушению нормальной передачи инсулинового сигнала и развитию инсулинорезистентности [250].

1.4. Факторы, регулирующие функционирование жировой ткани

В последние годы было установлено, что висцеральный жир является полноценным эндокринным органом, секретирующим большое количество активных факторов, оказывающих влияние на все системы органов, а не только хранилищем энергетических субстратов. Продукты секреции адипоцитов являются гормонами (лептин, адипонектин, резистин, висфатин, оментин, васпин и другие), воспалительными цитокинами (фактор некроза опухоли альфа, интерлейкин-6), протеинами ренин-ангиотензиновой системы. Также, в жировой ткани активно продуцируются половые стероиды и глюкокортикоиды. При ожирении нарушается секреция и действие указанных факторов, что является важным патогенетическим аспектом в развитии инсулинорезистентности, нарушения метаболизма глюкозы и липидов [4].

1.4.1. Адипокины

Лептин (от греч. leptos – тонкий), гормон белковой природы, который синтезируется клетками белой и бурой жировой тканей, скелетных мышц, желудка, плаценты, и является первым описанным и наиболее изученным адипокином. Адипоциты подкожной жировой клетчатки синтезируют лептина в 2,5 раза больше, чем висцеральный жир [89]. Лептин действует на центры голода и насыщения в гипоталамусе и контролирует массу тела благодаря снижению образования нейропептида-У, вызывающего чувство голода. Таким образом, лептин снижает потребление пищи и повышает расход энергии. Доказано, что при абдоминальном ожирении уровень лептина значительно увеличивается за счет его синтеза белой жировой тканью. При этом возникает гиперлептинемия, приводящая к компенсаторной резистентности гипоталамуса к центральному действию лептина [41]. Развитие резистентности к лептину связывают с ингибированием передачи сигнала от рецепторов к лептину независимо от наличия ожирения [132].

Абдоминальной жировой тканью также продуцируется адипонектин, который циркулирует в крови и оказывает противовоспалительные действия, обусловленные подавлением активности ядерного фактора каппа-б (NF-κB) - транскрипционного фактора макрофагов, моноцитов и эндотелиальных клеток [116]. Адипонектин снижает скорость образования в печени эндогенной глюкозы, что приводит к увеличению транспорта глюкозы в мышцы, активации окисления жирных кислот и повышению чувствительности тканей к инсулину. Содержание адипонектина снижено при ожирении, метаболическом синдроме и СД 2 типа, при снижении массы тела уровень адипонектина возрастает. Количество адипонектина в плазме крови находится в обратной зависимости от количества липопротеинов низкой плотности и триглицеридов и в прямой зависимости от уровня липопротеинов высокой плотности [251].

В 2001 г. группой ученых был обнаружен еще один гормон жировой ткани, названный резистином, «гормоном инсулинорезистентности». Резистин влияет на жировой обмен неоднозначно: сначала его концентрация повышается при дифференцировке адипоцитов, затем – резистин угнетает адипогенез на поздних этапах дифференцировки. Увеличение синтеза резистина связано с развитием инсулинорезистентности и дислипидемии. При ожирении уровень резистина повышается и приводит к подавлению захвата глюкозы клетками. Описаны функциональные взаимодействия резистина с уровнем лептина: введение лептина подавляет продукцию мРНК резистина, что проявляется снижением уровня глюкозы и инсулина. Участие резистина в стимуляции механизмов воспаления, активации эндотелия и пролиферации клеток гладкой мускулатуры сосудов дает основание рассматривать его в качестве маркера или даже этиологического фактора развития сосудистых заболеваний [212].

В 2005 г. был описан адипокин – висфатин, который синтезируется в основном в адипоцитах висцеральной жировой ткани. Висфатин является фактором роста пре-В-лимфоцитов, обеспечивая их созревание, а также активирует инсулиновые рецепторы, что играет физиологическую роль в регуляции инсулинпродуцирующих клеток и метаболизме мышечных клеток. Компенсаторная реакция повышения концентрации висфатина, направленная на снижение хронически повышенного уровня глюкозы наблюдается при ожирении, сопровождаемом инсулинорезистентностью и СД [89]. Установлено, что висфатин участвует в патогенезе ожирения в детском возрасте. Так, в ряде исследований было показано повышение в крови уровня висфатина у взрослых и детей, больных ожирением [89]. Уровень висфатина в крови прямо пропорционально коррелирует с индексом массы тела, окружностью талии и индексом инсулинорезистентности.

Оментин синтезируется в основном адипоцитами висцерального жира и его уровень повышен при ожирении и инсулинорезистентности.

Исследователями было показано благоприятное влияние оментина на воспаление, гомеостаз глюкозы и протективный эффект в отношении сердечно-сосудистой патологии [55].

Васпин (visceral adipose tissue-derived serpin, серпин A12) — член семейства ингибиторов сериновых протеаз, который синтезируется адипоцитами висцеральной жировой и подкожно-жировой тканей. Продукция васпина также была обнаружена в коже, гипоталамусе, печени, островках поджелудочной железы и желудке. Экспрессия висцерального васпина достоверно коррелирует с индексом массы тела, процентом жира и концентрацией глюкозы в плазме крови через 2 часа при проведении перорального глюкозотолерантного теста. Секрция васпина повышена при ожирении, инсулинорезистентности и сахарном диабете 2-го типа, а низкое содержание его в крови ассоциировано с высоким уровнем физической активности. На мышинных моделях ожирения и сахарного диабета наблюдалось повышение чувствительности тканей к инсулину и нормализация экспрессии генов жировой ткани при назначении рекомбинантного васпина. Таким образом, с настоящим моментом васпин рассматривается как адипокин, обладающий способностью повышать чувствительность к инсулину [55].

1.4.2. МикроРНК

С момента открытия феномена РНК интерференции в различных клетках были установлены многочисленные малые РНК участвующие в негативной регуляции (транскрипционной деградации или изоляции, подавлении трансляции мРНК) и, возможно, в механизмы позитивной регуляции (активации транскрипции и трансляции) [211]. Таким образом, микроРНК оказываются вовлечёнными в большую часть биологических процессов. Мишенями микроРНК являются от 30 до 60 % генов человека, кодирующих белок.

Механизм действия микроРНК основан на подавлении экспрессии генов: при соединении с комплементарными участками мРНК происходит ингибирование их трансляции. В последнее время появляются данные, указывающие на возможность взаимодействия микроРНК непосредственно с ДНК в процессе РНК-зависимого метилирования ДНК, которое является одним из ключевых эпигенетических механизмов репрессии генов [39].

Предшественник зрелой микроРНК – пре-микроРНК транскрибируется из интронных областей генома и содержит последовательность из 70 нуклеотидов. В цитоплазме пре-микроРНК разрезается ферментом Dicer, и в результате образуется дуплекс, содержащий две цепи микроРНК длиной в 22 нуклеотида, каждая из которых может выступать как функциональная микроРНК [139]. Однако лишь одна из них впоследствии войдёт в РНК-индуцируемый комплекс выключения гена (RNA-induced silencing complex (RISC)), в котором осуществляется взаимодействие микроРНК и её мРНК-мишени. Вошедшая в состав RISC микроРНК играет роль матрицы, распознающей определённую последовательность мРНК-мишени [207]. Центральную роль в функционировании RISC играют белки семейства Argonaute (Ago), которые имеют два центра, связывающих микроРНК: домен PAZ, взаимодействующий с участком на 3'-конце микроРНК, и домен PIWI, структурно напоминающий рибонуклеазу и связывающий 5'-конец микроРНК. Некоторые белки семейства Argonaute, например, Ago2 человека, непосредственно разрезают транскрипт-мишень. Белки этого семейства также могут привлекать дополнительные белки для осуществления репрессии трансляции [119]. Репрессия гена может осуществляться двумя путями: деградацией мРНК или предотвращением её трансляции. Если микроРНК полностью комплементарна мРНК-мишени, то Ago2 может разрезать мРНК и привести к её деградации. Если полной комплементарности нет, то репрессия достигается через блокировку трансляции. В настоящее время установлено, что микроРНК вызывает

деградацию мРНК-мишени, но механизм трансляционной репрессии (осуществляется ли она только через разрушение мРНК, только через подавление трансляции специальными факторами или комбинацией обоих механизмов) активно исследуется [3].

1.4.3. МикроРНК, ассоциированные с адипогенезом и чувствительностью к инсулину

1.4.3.1. МикроРНК -29

Семейство человеческих микроРНК hsa-miR-29 включает представителя miR-29a, miR-29b и miR-29c. Ген, кодирующий синтез предшественников miR-29b-1 и miR-29a, локализуется на хромосоме 7q32.3, предшественников miR-29b-2 и miR-29c — на хромосоме 1q32.2 [244]. Члены семейства miR-29 экспрессируются во многих тканях организма, включая сердце, почки, печень, бета-клетки поджелудочной железы, клетках скелетной мускулатуры и жировой ткани и других [158, 242, 244]. Для данного семейства микроРНК выявлено регулирующее действие на экстрацеллюлярный матрикс сердца [80], почек [213, 233], легких [200] и печени [230], показан выраженный антифибротический эффект [244]. В подтверждение этому, в работе Abonnenc M. et al. (2013) и van Rooij E. et al. (2008) продемонстрировано, что подавление miR-29, вызывает профибротический эффект [80, 88] и предотвращает расширение абдоминальной аневризмы аорты [226]. Экспериментальным исследованием на мышах с дефицитом miR-29 было показано значение этого семейства микроРНК в регуляции кардиометаболизма, благодаря поддержанию сердечно-сосудистой функции через транскрипционный коактиватор PGC1 α (Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator 1 α), который в свою очередь контролирует митохондриальный биогенез и гомеостаз. Исследование выявило, что отсутствие триггеров экспрессии miR-29 приводит к сердечно-сосудистому фиброзу, системной гипертензии, диастолической дисфункции. Полученные результаты позволили авторам

сделать вывод о значении miR-29 и PGC1 α , как терапевтических мишеней при кардиометаболических заболеваниях [243].

В работе Liang J. et al., продемонстрировано, что опосредованная аденовирусом избыточная экспрессия miR-29a в печени мышей линий db/db (с дефектом рецептора лептина и быстро нарастающей инсулинорезистентностью, линия C 57BL/KsJ-db/db) и DIO (Diet Induced Obesity, не устойчивые к высококалорийному рациону крысы с ожирением) снижала уровни глюкозы в крови натощак и улучшала чувствительность к глюкозе. По данным Liang J. et al. (2013) сверхэкспрессия miR-29a-c в культуре первичных гепатоцитов и печени мыши снижала уровни белка PGC-1 α и G6Pase (глюкоза-6-фосфатаза), прямых мишеней miR-29a-c, тем самым негативно регулируя процесс глюконеогенеза в печени [160]. Kurtz L. и соавт. (2014) была показана взаимосвязь между повышением экспрессии miR-29 и увеличением мРНК гена FOXA2 (кодирующий ядерный транскрипционный белок, играющий ключевую роль в энергетическом гомеостазе печени) в печени крыс Цукера (крысы с диабетическим ожирением). Авторы продемонстрировали, что miR-29 точно настраивает FOXA2-опосредованную активацию ключевых генов липидного обмена, включая PPARGC1A (коактиватор 1- α рецептора, активируемого пероксисомными пролифераторами γ), HMGCS2 (3-гидрокси 3-метилглутарил- коэнзимА- синтаза 2) и ABHD5(1-ацилглицерол-3-фосфат О-ацетилтрансфераза) [157].

Кроме того, установлено, что miR-29a/b/c участвуют в регуляции дифференцировки клеток, в том числе опухолевых, благодаря, в том числе, их проапоптотическому действию [244]. Другими возможными механизмами, лежащими в основе противоопухолевого эффекта семейства miR-29 являются: регулирование aberrантного метилирования ДНК путем таргетирования ДНК-метилтрансфераз 3A и 3B [137, 156], правильной дифференцировки миобласта, но не рабдомиосаркомагенеза путем

таргетирования YY1 (Yin Yang 1) [248] это транскрипционный репрессорный белок, кодируемый геном YY1 [190], супрессии интерферона γ [240] и таргетинга В-Myb (синоним MYBL2, V-Myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog-like 2, транскрипционный фактор семейства MYB), который связан с пролиферацией, дифференцировкой и выживаемостью клеток [34, 115]. Участие miR-29 в регуляции состояния внеклеточного матрикса связывают с их возможным влиянием на метастазирование [244]. По данным научной литературы имеются противоречивые результаты об уровнях экспрессии miR-29, так, при назофарингеальных карциномах сообщается о снижении экспрессии miR-29 [138], тогда, как при раке молочной железы и В-клеточном лимфолейкозе – о ее повышении [93, 56].

При исследованиях пациентов с сахарным диабетом и диабетических моделей животных было обнаружено увеличение уровня экспрессии miR-29b в различных тканях, включая печень [160, 180], β -клетки поджелудочной железы, скелетную мускулатуру и жировую ткань [53, 159]. Также, увеличение экспрессии miR-29b наблюдается в сыворотке у детей с недавно диагностированным сахарным диабетом 1 типа [58] и взрослых людей с недавно диагностированным сахарным диабетом 2 типа [221]. В популяционном исследовании [74], была выявлена достоверно повышенная экспрессия miR-29a в сыворотке крови у больных сахарным диабетом 2 типа, что позволило авторам назвать miR-29 «циркулирующим маркером СД и ожирения». Однако, Zampetaki A. et. al (2010) в популяционном исследовании показали достоверное снижение уровня miR-29b в плазме крови в период манифестации СД 2 типа [264].

Исследованиями Vagge A. B и соавт. (2012) было показано, что экспрессия miR-29 снижена в условиях гиперинсулинемии, но резко повышена при гипергликемии, сопровождающейся сниженным уровнем инсулина [159]. Согласно полученным данным по изучению экспрессии

представителей семейства микроРНК-29 было сделано заключение об их значении как ранних маркеров сахарного диабета 2 типа [226].

Многими исследованиями было показано развитие гипергликемии и диабета у пациентов после трансплантаций почек, сердца, печени, получавших лечение иммунодепрессантами, такими как рапамицин, сиролимус [82, 97, 223]. После трансплантаций рапамицин применяется поскольку является ингибитором киназы mTORC1, ингибирование которой приводит к блокаде сигнальных путей активации и пролиферации лимфоцитов, снижает активность Т- и В-лимфоцитов, что предотвращает отторжение трансплантата [68, 97, 189]. Такой побочный эффект, как развитие гипергликемии и диабета, объясняется тем, что киназа mTOR (mammalian Target of Rapamycin) – это также белок в сигнальном каскаде действия инсулина и IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1) через рецепторы к инсулину [57, 129, 188]. Блокада сигнального пути Akt/ПКВ (серин-треонин киназа B/protein kinase B) – mTOR приводит к ингибированию транслокации транспортеров глюкозы GLUT 4 на поверхность мембраны, что снижает поглощение глюкозы инсулинзависимыми тканями и, следовательно, способствует формированию гипергликемии [96]. Кроме этого обнаружено, что мыши дефектные по mTOR демонстрировали гипоплазию поджелудочной железы, имелись ее рудименты с отсутствием ацинарных и эндокринных клеток, что сопровождалось гипоинсулинемией и гипергликемией [216].

В исследовании He A. et al., (2007) на крысах линий Wistar и Goto-Kakizaki (GK, характеризуются гипергликемией, инсулинорезистентностью, дислипидемией, но не отличаются повышенным весом) и на культуре адипоцитов 3T3-L1 показано, что повышенная экспрессия miR-29a/b/c ассоциирована со снижением активности Akt/ПКВ, что приводит к снижению захвата глюкозы адипоцитами и развитию гипергликемии [198].

Ещё одной мишенью семейства miR-29 в инсулин чувствительных тканях является мРНК гена *insig 1* (Insulin Induced Gene 1), который является ключевым фактором в регуляции биосинтеза жирных кислот и холестерина, поскольку регулирует метаболизм холестерина, липогенез и гомеостаз глюкозы [36, 197]. Белок *Insig1* в мембране эндоплазматического ретикулама связывается с белком SCAP (SREBP Cleavage Activation Protein), активирующим расщепление транскрипционного фактора SREBP (Sterol Regulatory Element-Binding Protein), и препятствует его переносу в комплекс Гольджи, блокируя синтез холестерина и жирных кислот [46, 104, 69]. При инсулинорезистентности наблюдается сниженная экспрессия белка *Insig1*, следовательно, описанный выше механизм не функционирует, что приводит к усилению липогенеза [21]. Так, результаты исследований Carobbio S. и соавт. (2013) свидетельствуют о том, что снижение экспрессии микроРНК *Insig1* приводило к сохранению интактного белка SREBP1 в мембране эндоплазматического ретикулума и отсутствию его действия как фактора транскрипции ферментов гидроксиметилглутарил-КоА-редуктазы и SCD (steroyl-Co A desaturase 1) в белой жировой ткани у *insig1* knockout мышей. Аналогичные изменения были зафиксированы в экспериментах на мышах HFD (high-fat diet) с ожирением, индуцированным высоко жировой диетой и инсулинорезистентностью [21, 197].

Выявленное повышение экспрессии miR-29 при инсулинорезистентности ряд авторов связывают с его ингибирующим действием в отношении мРНК *Insig1*, что выражается в активации липогенеза. Данный вывод подтверждается тем, что ингибирование miR-29 путем трансфекции специфических олигонуклеотидов (locked nucleic acid, LNA) в клетки линии адипоцитов 3T3-L1, приводило к улучшению чувствительности к инсулину [198].

По данным He A. et al., у семейства микроРНК-29 может быть еще несколько альтернативных генов-мишеней, таких как кавеолин-2 (*cav2*) и

синтаксин-1 [198]. Кавеолин относится к группе мембранных белков рецептор-независимого эндоцитоза [122]. В клетке кавеолин связывается с липидами и образует кавеолы - колбообразные впячивания плазматической мембраны, участвующие в передаче сигнала клетки [31]. Снижение экспрессии Cav2 наблюдалась в инсулиночувствительных тканях у крыс с сахарным диабетом [94], что может быть связано со увеличением экспрессии miR-29. Не смотря на то, что в жировой ткани не подтверждена взаимосвязь Cav2 и инсулина, в клетках фибробластов инсулин увеличивает индукцию гена кавеолина-2. Активация кавеолина-2 в ответ на инсулин активирует нижестоящие сигнальные каскады в клеточном цикле, главным образом повышенное фосфорилирование внеклеточной сигнал-регулируемой киназы (extracellular signal-regulated kinase, ERK) и ядерную транслокацию фосфорилированного ERK [120]. Синтез ДНК и активация клеточного цикла с помощью инсулина происходят одновременно с увеличением взаимодействия между кавеолином-2 и фосфорилированным ERK и ядерной транслокацией этого комплекса [198].

Синтаксин 1 является трансмембранным белком, входящим в комплекс белков SNARE (soluble NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor, АТФаза) attachment receptor; белки, осуществляющие слияние внутриклеточных транспортных везикул с клеточной мембраной или органеллой-мишенью), и участвует в экзоцитозе [123]. В частности, синтаксин-1 участвует в слиянии пузырьков GLUT4 (глюкозный транспортёр тип 4) с плазматической мембраной посредством его взаимодействия с белком tunc18 и является мишенью для miR-29 [16, 52]. Синтаксин-1 также необходим для быстрого экзоцитоза инсулина в β -клетках поджелудочной железы [33], а высокий уровень глюкозы и липидов приводит к исчезновению синтаксина-1 при СД2 [81]. Эти данные показывают, что синтаксин-1 может быть еще одной заслуживающей внимания мишенью для miR-29 при сахарном диабете 2 типа.

1.4.3.2. МикроРНК- 126

Ген предшественника микроРНК-126 локализуется у человека на 9 хромосоме (chr9: 136670602136670686[+]).

Установлено, что miR-126 экспрессируется в поджелудочной железе [168, 141], печени [237], миокарде [144], скелетных мышцах [193], гладких мышечных клетках [193], тромбоцитах [164]. В ряде научных работ сообщается о дисрегуляции циркулирующей miR-126 при онкологической патологии [83, 167]. Содержание miR-126 в сыворотке крови может увеличиваться и уменьшаться в зависимости от типа опухоли [35, 65, 147].

Значительное число научных работ по изучению miR-126 посвящены в ее экспрессии и эффектам в эндотелиальных клетках и эндотелиальных апоптотических тельцах [234, 264]. Обнаружено, что miR-126 проявляет проангиогенное действие, способствует восстановлению сосудистой целостности и репарации ран [90, 234]. Механизмами проангиогенного эффекта miR-126 считается ингибирование мРНК двух отрицательных регуляторов сигнального пути сосудистого эндотелиального фактора роста (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) – белка SPRED1 (Sprouty-related, EVH1 domain-containing protein 1) и регуляторную субъединицу 2 фосфоинозитол-3-киназы (PIK3R2/p85-β), приводит к усиленной передаче сигналов VEGF [90]. Wang S. et al продемонстрировали, что проангиогенный эффект miR-126 первоначально коррелировал с подавлением экспрессии Spred1 и активацией сигнального пути MAPK [234]. Ген SPRED1 кодирует белок Spred-1, который помогает контролировать (регулировать) сигнальный путь Ras / MAPK. Путь Raf /Ras/MAPK участвует в росте и пролиферации, дифференцировке клеток и апоптозе. Белок Spred-1 присоединяется к белку Raf, блокируя передачу сигналов через путь Ras / MAPK [228]. Fish J. E. et al. считают, что miR-126 связывается с мРНК белка Spred-1, обеспечивая функционирование сигнального пути Raf /Ras/MAPK, инициированного

VEGF, и приводящего к пролиферации эндотелиальных клеток, то есть способствует ангиогенезу [90].

Регуляторная субъединица 2 (β) фосфатидилинозитол-3-киназы (PIK3R2) обладает ингибирующим действием в отношении PI3K, а также является мишенью miR-126. Выявлено, что miR-126 способна опосредованно регулировать действие VEGF, так как может связываться с мРНК PIK3R2, обеспечивая активацию сигнального пути PI3K/Akt и, следовательно, ангиогенез [90].

Togliato G. et al. исследовали содержание miR-126 в внеклеточных везикулах (EV), высвобождаемых стволовыми клетками жировой ткани (ASC – adipose derived stem cells), извлеченными из висцеральной и подкожной жировой ткани пациентов с ожирением. Было выявлено снижение ангиогенного потенциала у больных с ожирением обусловленное подавлением miR-126 и VEGF [194].

Одной из мишеней для miR-126 является мРНК VCAM-1 (CD106, англ. Vascular cell adhesion molecule 1, «сосудистая молекула клеточной адгезии 1») [146]. Экспрессия VCAM-1 и его рецептора коррелирует со скоростью доставки моноцитов в воспаленный эндотелий [229]. Так, Harris T. A. et al. показали, что эндогенный miR-126 подавляет экспрессию VCAM-1, связываясь с 3' UTR концом мРНК VCAM-1, тем самым уменьшая взаимодействия лейкоцитов с эндотелиальными клетками. Таким образом, увеличение уровня miR-126 приводит к ингибированию экспрессии VCAM-1 и снижает лейкоцитарную инфильтрацию в эндотелии [146].

Имеются данные об ингибирующем эффекте miR-126 на хемокин адипоцитов и моноцитов/макрофагов – CCL2 (мотив С-С лиганд 2) или MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein 1). Arner E. et al. (2012) изучали секрецию CCL2 в культурах дифференцированных *in vitro* адипоцитов от пациентов с ожирением (ИМТ > 30 кг/м²) при избыточной экспрессии одиннадцати

микроРНК. Результаты показали, что девять – miR-26a, -92a, 126, -143, -193a, -193b, -652, -let-7a и let-7d снижали секрецию CCL2 [24]. Однако, в эксперименте на культурах клеток адипоцитов мышей (3T3-L1) и моноцитов, полученных от больных острым моноцитарным лейкозом (ТНР-1), с помощью люциферазного анализа, показано, что только miR-126 оказывает прямое ингибирующее действие на мРНК CCL2, связываясь с ее 3' UTR фрагментом, и, соответственно, снижает секрецию данного хемокина. CCL2 известен как ключевой хемокин, участвующий в развитии воспаления в жировой ткани, индуцированного ожирением [102]. Следовательно, можно заключить, что регистрируемое при ожирении снижение экспрессии miR-126, является одной из причин развития воспаления в жировой ткани. Кроме этого, имеются сведения [51, 187, 199], что CCL2 вызывает развитие инсулинорезистентности в клетках скелетной мускулатуры и в адипоцитах. Повышенный уровень CCL2 может изменять функцию адипоцитов, поскольку добавление CCL2 к дифференцированным адипоцитам *in vitro* снижает стимулированное инсулином поглощение глюкозы и экспрессию генов (липопротеиновая липаза, адипсин, GLUT-4, aP2 - белок адипоцитов 2, β 3-адренергический рецептор и PPAR γ) связанных с адипогенезом. Результаты проведенных исследований [24, 219].

Ключевым целевым геном miR-126 в контексте развития сахарного диабета 2 типа и его сосудистых осложнений является ген субстрата-1 инсулинового рецептора (IRS-1), что подтверждено результатами люциферазного анализа [143]. IRS-1 является основной молекулой в передаче сигналов инсулина, от рецептора инсулина, повышая экспрессию VEGF, через сигнальные пути PI3K/Akt и Ras/MAPK в эндотелиальных клетках [54, 117]. В исследовании Fang S. и соавт. (2017) на модели диабетической ретинопатии у мышей было выявлено, что в эндотелиальных клетках сосудов и перicyтах сетчатки экспрессия miR-126 значительно снижена, IRS-1 и VEGF – повышена по сравнению контрольной группой. Трансфекция в

культуры эндотелиальных клеток сосудов и перицитов сетчатки аналога miR-126 (miR-126mimic) привела к достоверному снижению экспрессии IRS-1 и VEGF, а также уменьшению числа эндотелиоцитов и перицитов способных к инвазии. Напротив, при трансфекции данных культур клеток ингибитором miR-126 (anti-miR-126) выявлено значимое повышение экспрессии IRS-1, VEGF и увеличение числа инвазивных эндотелиоцитов и перицитов [143]. Таким образом, результаты проведенного исследования свидетельствуют о потенциальном терапевтическом значении miR-126, как ингибитора сигнального пути IRS-1/PI3K/Akt/VEGF, для лечения сосудистых осложнений при сахарном диабете.

Тао Н. и соавт. (2016) продемонстрировали на модели крысиной инсулиномы β -клеток поджелудочной железы, что miR-126 в β -клетках действует непосредственно на мРНК IRS-2, подавляя тем самым стимулированную глюкозой пролиферацию этих клеток. Авторы сделали вывод о том, что дезорганизация экспрессии IRS-1 и IRS-2 может являться одним из звеньев патогенеза сахарного диабета 2 типа [168].

Многочисленные исследования свидетельствуют о снижении количества циркулирующей miR-126 при сахарном диабете 2 типа. Так, при когортном популяционном исследовании, Zampetaki A. и соавт. обнаружили стабильную связь между miR-126 и сахарным диабетом 2 типа, продемонстрировав, что при повышенной концентрации глюкозы в крови резко снижается экспрессия miR-126 в эндотелиальных клетках и крови [264]. Liu Y. и соавт. (2010) предположили, что секреция miR-126 может стимулироваться инсулином и подавляться высоким уровнем глюкозы в крови [246]. Значительное снижение циркулирующей miR-126 может способствовать развитию микро- и макро-сосудистых осложнений при сахарном диабете 2 типа [209]. Результаты исследования Al-Kafaji G. и соавт. (2016) продемонстрировали наличие отрицательной корреляции между уровнем экспрессии, циркулирующей miR-126 и степенью микро- и

макроальбуминурии у больных сахарным диабетом 2 типа [70]. Исследованиями Witkowski M. et al. (2015) показано, что у больных сахарным диабетом с исходно сниженным уровнем циркулирующего miR-126 и повышенной активностью тканевого тромбопластина (син. тканевой фактор, фактор свертывания III) после проведенного курса лечения метформином наблюдалось повышение экспрессии данной микроРНК и снижалась активность тканевого тромбопластина [145]. При этом лечение пациентов препаратами сульфаниламочевины не оказывало аналогичного эффекта. Авторы сделали вывод об антитромботических свойствах miR-126 при сахарном диабете.

Представляют интерес исследования зависимости уровня экспрессии микроРНК от физической активности. Так, было установлено, что уровень экспрессии miR-126 в скелетных мышцах у крыс линии SHR (spontaneously hypertensive rats) с гипертензией был достоверно снижен по сравнению с группой здоровых крыс линии Wistar Kyoto (WKY) [231]. Также было показано, что физическая нагрузка (в виде плавания по одному часу, 5 дней в неделю, в течение 10 недель) приводила к существенному повышению уровня miR-126 в скелетных мышцах крыс линии SHR. При этом в скелетных мышцах было выявлено улучшение показателей микроциркуляции, значимое повышение концентраций VEGF и eNOS (эндотелиальная синтаза оксида азота) и снижение уровня ингибитора VEGF – PIK3R2 [86, 231]. Затем, данная группа исследователей изучила эффект влияния физической нагрузки на показатели ангиогенеза и микроциркуляции у крыс линии Цукера (Zucker rats) с ожирением. У крыс опытной группы, подвергшихся тренировкам согласно вышеуказанному протоколу эксперимента, обнаружено значимое повышение исходно сниженного уровня miR-126, достоверные повышение концентраций VEGF и eNOS и снижение уровня PIK3R2, а также улучшение показателей микроциркуляции [193]. Schmitz B. и соавт. (2017) обнаружили зависимость уровня циркулирующей

miR-126 от интенсивности физической нагрузки. У здоровых студентов после физкультурных занятий концентрация miR-126 в крови повышалась при средней интенсивности нагрузки и снижалась при высокой интенсивности [77].

Таким образом, miR-126 может служить многообещающим молекулярным маркером для диагностики метаболического синдрома, а ее синтетические аналоги – средством профилактики и лечения микро- и макрососудистых осложнений сахарного диабета 2 типа.

1.4.3.3. МикроРНК- 132

Ген микроРНК-132 у человека локализуется на 17 хромосоме. Гены miRNA-132 и miR-212 расположены в соседних локусах, формируя кластер miRNA-132/-212, поэтому их транскрипционный контроль является согласованным, то есть считается, что эти две микроРНК регулируют в значительной степени перекрывающийся набор транскриптов [179].

Мишенями miR-132 являются мРНК факторов, которые регулируют ключевые биологические процессы, включая пролиферацию клеток и их метаболизм [99, 127, 134, 241, 150], воспаление [149], холинергические функции, связанные с нервной системой [227], а также врожденный противовирусный иммунитет [169]. Обнаружено, что уровни miR-132 ассоциированы с депрессией, тревожными расстройствами, психологическим стрессом [133]. Имеются данные о повышении экспрессии miR-132 в воспаленной кишечной ткани у пациентов с болезнью Крона и язвенным колитом [148], в печени у мышей с экспериментальным алкогольным стеатозом [38] и у людей с гепатоклеточной карциномой [204].

Результаты экспериментальных исследований продемонстрировали повышенную экспрессию miR-132 и -212 в культурах бета-клеток поджелудочной железы линии мышей ob/ob и db/db (линия мышей с мутацией в гене рецептора к лептину, проявляется ожирением, бесплодием,

задержкой роста тела в длину, гиперинсулинемией, нарушением иммунитета) [192] и HFD (high fat diet – линия мышей с ожирением, индуцированной диетой, с толерантностью к глюкозе и сахарным диабетом 2 типа) [105]. При этом было показано, что происходящее в присутствии повышенных концентраций пальмитата и глюкозы (гиперлипидемия и гипергликемия, т.е. состояния, характерные для диабета и преддиабета) увеличение экспрессии miR-132 положительно коррелирует с повышением массы и активности бета-клеток [105]. Авторы предположили, что причинами данных компенсаторных эффектов бета-клеток, ассоциированных с увеличением экспрессии miR-132, могут быть, с одной стороны, увеличение экспрессии MafA (транскрипционный фактор, регулирующий транскрипцию гена инсулина в ответ на уровень глюкозы в сыворотке, специфичный для β -клеток), стимулирующего пролиферацию и секреторную активность бета-клеток и, с другой стороны, снижение синтеза грануфиллина (granuphillin, SLP-4), угнетающего секрецию инсулина. Проведенный вестерн-блот подтвердил предположение только в отношении MafA. Таким образом, был сделан вывод о протективной роли miR-132, увеличение экспрессии которой при гиперлипидемии и гипергликемии, в компенсации синтеза инсулина, за счет повышения уровня MafA. Однако, при усугублении ожирения, сопровождающегося повышением экспрессии miR-146a, miR-199a-5p, miR-199a-3p, miR-203, miR-210 и miR-383, ассоциированных с дисфункцией и апоптозом бета-клеток [105, 28, 114] происходит декомпенсация данных адаптивных изменений.

Изучение экспрессии miR-let-7a, -122, 132, -212 и -181 в культуре первичных гепатоцитов крыс при повышенной концентрации инсулина показало увеличение уровня только miRNA-132 и -212 при одновременном снижении CYP2E1 (цитохром подсемейства CYP2, относящийся к системе цитохромов P450) [109]. Субстратами для окисления данным типом цитохромов являются многие лекарственные средства (парацетамол,

верапамил), а также жирные кислоты, такие как арахидоновая, линоленовая [205]. Результаты люциферазного анализа продемонстрировали комплементарность нуклеотидных последовательностей miR-132/-212 и 3' UTR мРНК CYP2E1 крыс. При проведении данного эксперимента в присутствии ингибиторов PI3-K, Akt и mTOR выявлено значительное подавление опосредованного инсулином повышения miR-132, -212 [109]. Однако, результаты клинических исследований показали увеличение уровня CYP2E1 в крови пациентов с ожирением и сахарным диабетом 2 типа [75, 87].

Еще одной мишенью для miR-132 в клетках печени и жировой ткани является мРНК SirT1 (Silent Information Regulator 1, сиртуин 1 – класс гистоновых НАД-зависимых деацетилаз). С помощью люциферазного теста было установлено связывание miR-132 с 3' UTR мРНК SirT1 [134]. Уровни белка SirT1 *in vivo* увеличиваются при голодании, а снижаются с возрастом и старением [121]. Результаты экспериментальных исследований свидетельствуют о том, что уровень SirT1 снижен при культивировании культуры клеток линии C2C12 миоцитов мышечной ткани [29] и первичной культуры гепатоцитов мышечной ткани [191] в условиях повышенного содержания глюкозы в культуральной среде. Исследование Picard F. и соавт. (2004) продемонстрировало, что Sirt1 является негативным регулятором адипогенеза за счет репрессии PPAR γ [225]. Так, в эксперименте на культуре адипоцитов мышечной ткани 3T3-L1 авторы показали, что оверэкспрессия Sirt1 приводила к репрессии PPAR γ за счет взаимодействия с его кофакторами – NCoR (nuclear receptor co-repressor) и SMRT (silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors). Результатом такого взаимодействия было снижение активности адипогенеза, о чем свидетельствовало значимое снижение накопления красителя Oil Red O и содержания триглицеридов в клетках культуры. При этом, напротив, ингибирование экспрессии Sirt1 приводило к достоверному повышению указанных выше показателей, характерных для активного адипогенеза.

Аналогичный эффект Sirt1 установлен и в отношении клеток печени. Было показано, что гепатоцит-специфическая делеция SIRT1 у мышей линии HFD приводила к снижению активности β -окисления жирных кислот, развитию стеатоза печени и воспалению [99]. Приведенные факты свидетельствуют, что фармакологическая активация SIRT1, важного фактора регуляции гомеостаза липидов в печени и жировой ткани, может быть использована для профилактики стеатоза печени и ожирения, что может быть реализовано с помощью ингибиторов miR-132 antimiRNA).

Известна еще одна негистоновая мишень SirT1 – p65 субъединица NF κ B (nuclear factor kappa B), фактора транскрипции, контролирующего экспрессию генов иммунного ответа, провоспалительных цитокинов, апоптоза). Экспериментальное изучение преадипоцитов и дифференцированных *in vitro* адипоцитов, полученных из мезенхимальных стволовых клеток (МСК) висцеральной жировой ткани человека, и культивированных при повышенной концентрации глюкозы, показало, что сверхэкспрессия miR-132 снижала SirT1-опосредованное деацетилирование p65, приводящее к активации NF κ B и синтезу IL-8 и MCP-1 [134]. В исследовании Yoshizaki T. и соавт. (2009) также было установлено, что репрессия гена SIRT1 интерферирующими РНК (RNAi) в культурах адипоцитов мышей 3T3-L1 и первичных культурах висцеральных адипоцитов HFD мышей приводила к достоверному снижению мРНК провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-6, ФНО- α и хемокина MCP-1 [224]. При этом авторы выявили ингибирование инсулин-стимулированной транслокации GLUT4, что, по их мнению, свидетельствует о роли SirT1, как позитивного регулятора сигнального каскада инсулина в жировой ткани.

Таким образом, miR-132, увеличенная экспрессия которой наблюдается при повышенном уровне глюкозы, а также способная связываться с мРНК SirT1, ингибирует эффекты последнего, что выражается в активации адипогенеза, воспаления и в развитии инсулинорезистентности.

Meng Y. и соавт. (2018) обнаружили повышение miR-132 в МСК выделенных из жировой ткани свиней с ожирением и метаболическим синдромом [239]. Kloting N. и соавт. (2009) выявили значимые корреляции между экспрессией miRNA-17-5p, -99a, -132, -134, -145, 181a, -197 в висцеральной и подкожной жировой ткани и метаболическими параметрами, такими как уровни глюкозы в плазме натощак, лептина, адипонектина, интерлейкина-6, гликированного гемоглобина (HbA1c), а также объемом висцерального жира [140]. Эти и ряд подобных научных исследований сообщают о повышении экспрессии miR-132 в жировой ткани при ожирении, тогда как в доступной нам литературе мы обнаружили результаты единичных исследований уровня циркулирующей miR-132 в крови пациентов с ожирением. Так, результаты исследования Heneghan H. M. и соавт. (2011) свидетельствуют, что экспрессия miR-132 у пациентов с ожирением в висцеральном жире повышена, а в цельной крови снижена, по сравнению с этими показателями у пациентов с нормальной массой тела и коррелируют с индексом массы тела, уровнем глюкозы в крови натощак и HbA1c [76]. Однако, согласно результатам мета-анализа, проведенного Zhu H. и соавт. (2015), уровень циркулирующей miR-132 при сахарном диабете 2 типа повышен, что позволило авторам рассматривать данную микроРНК как биомаркер этой патологии [266].

1.4.3.4. МикроРНК- 143

Ген miR-143 у человека расположен на 5 хромосоме (chr5: 149428918-149429023 [+]).

Экспрессия miR-143 обнаруживается у человека и животных в сыворотке крови, в клетках гладкой мускулатуры [174], эпителиальных клетках почечных канальцев [171], печени [195], жировой ткани [151], некоторых видах опухолей [113, 172, 173].

Действие miR-143 при онкологической патологии представляет большой интерес для изучения. Известно ее действие в качестве ингибитора туморогенеза в клетках аденокарциномы поджелудочной железы [173]. Обнаружено снижение экспрессии miR-143 в клетках аденокарциномы легкого [113], в клетках плоскоклеточного рака носа [172]. Снижение сывороточной экспрессии miR-143 в комбинации с miR-4636 является показателем неблагоприятного прогноза при раке шейки матки [201]. Однако, установлено повышение уровня miR-143 в сыворотке крови при раке яичников [91], при колоректальном раке и аденомах толстого кишечника [62].

Jordan S.D. и соавт (2011) выявили повышение экспрессии miR-143 в печени мышей линий ob/ob и HFD, и, при помощи количественного масс-спектрометрического анализа экспрессии печеночных белков, показали зависимое от miR-143 снижение белка, связывающего оксистерол-связывающий белок (ORP) 8 [195]. ORP8 находится в эндоплазматическом ретикулуме и действует в качестве датчика стеролов, которые регулируют клеточные функции от метаболизма стеролов и нейтральных липидов до транспорта внеклеточных везикул и передачи клеточных сигналов [262]. ORP8 регулирует количество активных ядерных SREBP, таким образом влияя на липидный обмен *in vivo* и *in vitro* [196].

Также обнаружено опосредованное ингибирующее действие ORP8 на Akt, что способствует нормальной чувствительности к инсулину в клетках печени [195]. Увеличение экспрессии miR-143 приводит к подавлению ORP8 и, следовательно, активации Akt, которая фосфорилирует и ингибирует фактор транскрипции FoxO, рецептор-коактиватор-1 α , активируемый пролифератором пероксисом (PGC-1 α) и другие, тем самым прекращая экспрессию белков, контролирующих скорость ферментов глюконеогенеза. Таким образом, путь miR-143-ORP8 может являться потенциальной мишенью для лечения диабета, связанного с ожирением.

miR-143 является одной из наиболее изученных микроРНК в контексте адипогенеза, и впервые была идентифицирована как положительный регулятор дифференцировки адипоцитов у человека через сигнальный путь ERK5 [151]. ERK5 является членом семейства MAPK и стимулирует рост и пролиферацию различных типов клеток в ответ на передачу сигналов тирозинкиназы [44]. Дифференцировка стромальных клеток, полученных из жировой ткани (ADSC – adipose derived stem cells) в адипоциты является сложным физиологическим процессом, который включает клональную экспансию, остановку роста и терминальную дифференцировку. ERK5 участвует в регулировании баланса между пролиферацией и дифференцировкой адипоцитов в процессе адипогенеза. При этом ингибирование miR-143 белка ERK5 в преадипоцитах, либо непосредственно, через связывание с 3'UTR мРНК ERK5, либо косвенно через MAP2K5, способствует поддержанию дифференцированного состояния адипоцитов [151]. Так, Chen L. и соавт. (2014) обнаружили, что экспрессия miR-143 временно снижена после адипогенной индукции, а затем, начиная с 3 дня, увеличивается и достигает пика на 7 день после индукции. Таким образом, влияние miR-143 не однозначно в процессе дифференцировки адипоцитов, ее регуляторная роль зависит от стадии процесса. Также исследователи показали, что экспериментально избыточная экспрессия miR-143 на стадии клональной экспансии приводит к ингибированию адипогенной индукции ADSC, тогда как на терминальной стадии адипогенеза способствует дифференцировке преадипоцитов в адипоциты [152]. Вдобавок было показано, что miR-143 прямо подавляет MAP2K5, ключевой компонент семейства MAPK киназ в пути передачи сигналов MAPK, которые опосредуют все этапы адипогенной дифференцировки. MAP2K5 – это киназа, которая непосредственно фосфорилирует ERK5. На стадии клональной экспансии синтез ДНК и клеточное деление требуют активации сигнального пути MAPK и miR-143 снижена, однако на стадии

терминальной дифференцировки активация miR-143 ингибирует MAPK и, следовательно, дифференцировку клеток посредством фосфорилирования PPAR γ . MAP2K5 является целевым геном miR-143, что подтверждено с помощью программ прогнозирования мишеней miRanda® и MicroCosm, а также по результатам исследований *in vitro*: сверхэкспрессия miR-143 подавляла экспрессию белка MAP2K5, тогда как ингибирование miR-143 усиливало экспрессию MAP2K5 [152]. Так, в эксперименте введение в культуру клеток синтетической miR-143 на стадии клональной экспансии приводит к подавлению экспрессии MAP2K5. Как субстрат фосфорилирования для MAP2K5, активированный ERK5 уменьшается, блокируя тем самым клональную экспансию клеток. Далее, транскрипционный фактор C/EBP- α , который запускается синтезом ДНК и изменениями в структуре хроматина во время клональной экспансии, подавляется, что, в итоге, приводит к ингибированию адипогенной дифференцировки.

Zhang P. и соавт (2018) с помощью люциферазного анализа установили, что 3'UTR мРНК MAPK7 является мишенью для miR-143 в линиях 3T3-L1 адипоцитов. Исследователи также подтвердили, что повышение экспрессии указанной микроРНК ингибирует пролиферацию преадипоцитов и усиливает их дифференцировку, регулируя метаболизм жирных кислот [153].

Вае I. S. и соавт. (2017) продемонстрировали на культурах 3T3-L1 адипоцитов взаимосвязь экспрессии miR-143 и PPAR γ : при проведении реакции иммунопреципитации хроматина установили наличие двух элементов ответа пероксисомных пролифераторов (PPRE - peroxisome proliferator response elements) в промоторной области miR-143, которые принимают участие в активации PPAR γ , что было дополнительно подтверждено люциферазным исследованием. Эти данные показывают, что, как PPAR γ может активировать транскрипцию miR-143 в адипоцитах,

связываясь с его промотром, так и увеличение экспрессии miR-143 опосредованно, через PPAR γ регулирует адипогенез [206].

Takanabe R. и соавт. (2008) также продемонстрировали повышение экспрессии miR-143 в висцеральном жире у линии мышей HFD, которое коррелировало с повышенной массой тела и массой висцерального жира. Кроме того, уровни miR-143 тесно коррелировали с уровнями экспрессии маркеров дифференцировки адипоцитов, таких как PPAR γ и aP2, а также уровня лептина в плазме [256]. Xie H. и соавт. (2009) также продемонстрировали проадипогенное повышение miR-143 в линии 3T3-L1 адипоцитов, однако *in vivo*, в линии мышей ob/ob при эктопическом повышении уровня ФНО α показали снижение экспрессии этой микроРНК, резюмируя что воспаление, связанное с ожирением может дисрегулировать действие miR-143 [261]. Nazari M. и соавт. (2018) в исследовании влияния конъюгированной линоленовой кислоты (CLA) на ожирение продемонстрировали, что повышение экспрессии miR-143 у крыс HFD нивелировалось при приеме CLA [25].

Xihua L. и соавт. (2019) исследовали экспрессию микроРНК у больных с метаболическим синдромом, и обнаружили изменение экспрессии 27 микроРНК в образцах сыворотки крови и мочи по сравнению со здоровыми контролями. В частности, у пациентов с метаболическим синдромом, уровень miR-143-3p оказался значительно повышен в сыворотке крови и моче и, по мнению авторов, являлся независимым фактором риска инсулинорезистентности [63]. Также, было показано наличие двух новых мишеней для miR-143: рецептор инсулиноподобного фактора роста 2 (IGF2R – insulin growth factor 2 receptor) и белок, связывающий инсулиноподобный фактор роста 5 (IGFBP5 - insulin growth factor binding protein 5). Кроме того, инсулин стимулирует транслокацию IGF2R на поверхность клеточной мембраны, продвижение клиренса IGF2. IGF2 также может увеличить поглощение глюкозы в 3T3-L1 адипоцитах и человеческих адипоцитах [128].

Zhang W. R. и соавт. (2017) показали, что miR-143 регулирует пролиферацию и дифференцировку спутниковых клеток бычьей скелетной мышцы путем ингибирования IGFBP5 [170]. miR-143 также напрямую регулирует экспрессию IGFBP5 во время регенерации мышц [26]. Таким образом, эти исследования демонстрируют важность циркулирующего miR-143-3p в сигнальных путях действия инсулина у пациентов с метаболическим синдромом и линии мышей HFD. Увеличение циркулирующей miR-143-3p способствует развитию метаболических нарушений, вызванных ожирением. И, наоборот, подавление циркуляции miR-143-3p предотвращает вызванную ожирением резистентность к инсулину, толерантность к глюкозе и накопление липидов посредством регуляции IGF2 - IGF2R и IGFBP5 путей.

Wijayatunga N. N. и соавт. (2018) обнаружили повышенную экспрессию miR-143-3p в висцеральном жире у линии мышей HFD, а также положительную корреляцию с экспрессией генов стресса эндоплазматического ретикулума (ER) [30], который играет важную роль в воспалении жировой ткани [265]. Menikdiwela K. R. и соавт. (2018) в своем исследовании подтвердили эту гипотезу, а также показали взаимосвязь активации ренин-ангиотензиновой системы (RAS) и экспрессии miR-143 в жировой ткани у мышей, линиях 3T3-L1 адипоцитов и человеческих адипоцитов: активация RAS приводит к ингибированию транскрипции miR-143, а использование антагонистов RAS (каптоприл и телмисартан) увеличивает ее экспрессию [32].

Dahlman I. и соавт. (2017) исследовали транскриптом микроРНК белой подкожной жировой ткани человека и изолированных адипоцитов и не обнаружили достоверной разницы в экспрессии miR-143-3p у женщин с ожирением и инсулинорезистентностью, по сравнению с женщинами с ожирением и нормальной чувствительностью к инсулину. В подкожной жировой ткани и изолированных адипоцитах miR-143-3p экспрессировалась на одинаковом уровне. Однако, при проведении функциональных

исследований культуры адипоцитов с использованием синтетической *mimic miR-143 in vitro*, оказалось, что оверэкспрессия *miR-143-3p* усиливает стимулированный инсулином липогенез в жировых клетках человека [66]. Это происходит посредством увеличения фосфорилирования АКТ2 (РАС-бета серин/треониновая протеинкиназа, активирующая транслокацию GLUT4) с последующим ингибированием PRKAA2 (2 α -субъединица 5-АМФ активированной протеинкиназы). PRKAA2 является субъединицей комплекса АМПК (5-АМФ активированная протеинкиназа), которая активируется при истощении энергии и включении катаболических процессов [98]. Дефицит 2-субъединицы АМПК приводит к гипертрофии жировой ткани [106], а у мышей с нокаутированным геном PRKAA2 снижается чувствительность периферических тканей к инсулину. АМПК менее активна в жировой ткани пациентов с инсулинорезистентностью и ожирением, чем у субъектов с нормальной чувствительностью к инсулину и весом [111]. Мишень *miR-143-3p* АКТ2 является важной молекулой в сигнальном пути действия инсулина, которая может быть фосфорилирована и активирована таким ферментами, как фосфатидилинозитол-3-киназой, 3-фосфоинозитид-зависимой протеинкиназой-1 и mTOR-2 / PDK2 [255].

Данные об уровне экспрессии циркулирующей *miR-143* при абдоминальном ожирении весьма противоречивы. Так, Kilic I. D. и соавт. (2015) при исследовании экспрессии циркулирующей *miR-143* обнаружили достоверное снижение уровня ее экспрессии у больных с ожирением и избыточной массой тела, по сравнению с контрольной группой с нормальным ИМТ [135]. Напротив, Hadeel A. продемонстрировал достоверное повышение экспрессии циркулирующей *miR-143* у детей подросткового возраста, страдающих морбидным ожирением [27]. Cannataro R. и соавт (2019) продемонстрировали изменение экспрессии циркулирующих микроРНК, ассоциированных с адипогенезом у людей с ожирением после кетогенной диеты, среди них *miR-143* экспрессировалась

достоверно выше спустя 6 недель диеты [118]. У пациентов с ревматоидным артритом и ожирением экспрессия miR-143 в плазме крови достоверно коррелирует с уровнем воспалительных маркеров – IL-6 и IL-8 [203].

Эти результаты показывают, что miR-143 играет важную роль в адипогенезе и развитии инсулинорезистентности, но данные различных исследований противоречивы, следовательно, необходимо продолжение изучения уровня экспрессии этой микроРНК и ее корреляций с показателями углеводного и липидного обменов для понимания роли в патогенезе инсулинорезистентности и разработки новых терапевтических стратегий ее коррекции.

1.4.3.5. МикроРНК- 155

Ген, кодирующий miR-155 у человека, находится на 21 хромосоме (chr21: 25573980-25574044 [+]).

Множество исследований посвящено влиянию miR-155 на действие иммунной системы. Экспрессия miR-155 наблюдается в функционально различных множествах Т-клеток, В-клетках, НК-клетках, макрофагах и дендритных клетках, где она транскрибируется в результате активации или дифференцировки клеток [178, 130]. miR-155 также высоко экспрессируется в миелоидных и лимфоидных злокачественных новообразованиях, где она играет роль онкогена [19, 215].

Одной из главных мишеней miR-155 в иммунных и мезенхимальных стволовых клетках, а также адипоцитах является мРНК ССАТ/энхансер-связывающего белка (С/ЕВР) [22, 154, 222]. Дифференцировка бурого и белого жира имеет много транскрипционных регуляторов [252], существует специфичность определенных С/ЕВР для белого жира, по сравнению с бурым: активация С/ЕВР α необходима для дифференцировки белой жировой ткани, но не бурой [49]. Анализ С/ЕВР α -, С/ЕВР β - и С/ЕВР δ -нокаутных мышей выявил преобладающую роль активности С/ЕВР β в бурых адипоцитах (ВАТ – brown adipose tissue), а также небольшое влияние в

отношении белого жира (WAT) [72]. Этот эффект активности C/EBP β в WAT может быть объяснен различиями в длительности экспрессии C/EBP β в период дифференцировки кеток, приводящей к фенотипу бурой жировой ткани [50] и/или его взаимодействием с транскрипционным корегулятором – белком PRDM16 (PR domain containing 16). PRDM16 и C/EBP β одновременно экспрессируются в WAT и образуют транскрипционный комплекс, который направляет дифференцировку стволовых клеток на бурые жировые [108]. Интересно, что сверхэкспрессия лишь одного C/EBP β индуцирует фенотип, похожий на бурые жировые клетки в белых адипоцитах [50]. Правильный выбор времени экспрессии C/EBP β имеет решающее значение для адипогенной дифференцировки. Сложная сеть регуляторов контролирует экспрессию и функцию C/EBP β . Среди них есть адипогенные гормоны, такие как инсулин, факторы транскрипции (например, CREB, Noxc8 и Plac8), а также пост-транскрипционные регуляторы (например, KSR1 - kinase suppressor of Ras 1 и TRB3 – tribbles homolog protein 3) [85, 202, 220, 245, 254]. Пост-транскрипционная регуляция на основе miR-155 добавляет еще один уровень регуляции адипогенеза. miR-155 демонстрирует интересную временную картину экспрессии с высокими уровнями во время пролиферации преадипоцитов и снижением экспрессии во время созревания.

В целом miR-155 можно классифицировать как ингибитор адипогенеза бурого жира. Chen Y. и соавт. (2013) обнаружили обратную отрицательную регуляцию между miR-155 и C/EBP β , которая объединяет про- и антиадипогенные сигналы [177]. Одним из таких антиадипогенных сигналов является TGF β 1, который секретируется пролиферирующими преадипоцитами и индуцирует экспрессию miR-155. Высокие уровни miR-155 ингибируют экспрессию C/EBP β , тем самым подавляя преждевременную дифференцировку и удерживая преадипоциты в недифференцированном состоянии. Проадипогенные гормоны индуцируют экспрессию C/EBP β , что, в свою очередь, ингибирует транскрипцию VIC/miR-155. Таким образом,

этот механизм двойной отрицательной обратной связи приводит к приверженности одному из двух возможных состояний, создающих бистабильную систему [40]. Бистабильная петля miR-155/C/EBP β могла эволюционировать для преобразования слабых или только временно доступных внешних сигналов в сильный ответ, обеспечивая равномерный ответ клеток-предшественников на сигналы, которые либо ингибируют, либо индуцируют адипогенез.

Известно, что TNF α ингибирует адипогенез, но молекулярный механизм этого ингибирования до некоторых пор оставался неясным. В своем исследовании Liu S. и соавт. (2011) обнаружили, что TNF α -индуцированное ингибирование адипогенеза в основном происходит, когда преадипоциты 3T3-L1 обрабатывают TNF α в течение 2 ч после индукции адипогенеза. Обработка TNF α приводит к усилению экспрессии miR-155 через путь NF κ B в клетках 3T3-L1. Эта сверхэкспрессия miR-155 может подавлять экспрессию C/EBP β и CREB путем нацеливания на их 3'-нетранслируемые области (3'-UTRs). Важно, что анти-miR-155 снижает TNF α -индуцированное ингибирование адипогенеза, тогда как экзогенная экспрессия miR-155 ингибирует адипогенез. Взятые вместе, эти результаты показывают новую роль TNF α в регуляции антиадипогенных микроРНК [125].

Andrew D. G и соавт. (2016) изучали экспрессию miR-155 в жировой ткани мышей линии HFD. Мыши, нокаутированные по miR-155, были полностью защищены от ожирения, вызванного диетой: при HFD не набирали значительный вес, в отличие от обычных мышей, получавших контролируемый рацион. Устойчивость к ожирению самок мышей с делецией miR-155 не была обусловлена изменением потребления энергии или активности; скорее они увеличивали выделение энергии в виде тепла, по сравнению контрольной группой мышей. Изменения в высвобождении энергии могут быть опосредованы регуляцией адипоцитов, поскольку

преадипоциты у мышей, нокаутированных по miR-155, продемонстрировали повышенную способность дифференцировки и были смещены в сторону бурого фенотипа. Этот сдвиг в сторону бурых жировых клеток, вероятно, увеличивает расход энергии (избыточное хранение в виде жира). В совокупности эти данные свидетельствуют о том, что делеция miR-155 улучшает устойчивость к ожирению, вероятно, за счет умеренного уменьшения воспаления WAT и смещения преадипоцитов в сторону фенотипа бурой жировой ткани [175].

Corral-Fernandez N. E. и соавт (2013) выявили снижение циркулирующей miR-155 у пациентов с сахарным диабетом 2 типа [79]. Позднее, Lin X. и соавт. (2016) подтвердили эти результаты своим исследованием [176]. Кроме того, было обнаружено снижение уровня циркулирующей miR-155 в плазме у пациентов с ишемической болезнью сердца и диабетом [61], также экспрессия miR-155 была снижена в тканях почек, сердца, аорты в эксперименте у крыс [18]. Однако причинно-следственная связь между нарушением регуляции miR-155 и диабетом или осложнениями диабета остается неизвестной, и необходимы дальнейшие исследования, чтобы точно выяснить роль miR-155 при осложнениях сахарного диабета, а также лежащих в его основе механизмов. Более того, трудно точно сказать, откуда взялись miRNAs в сыворотке крови, ввиду сложности получения биопсийных образцов для определения специфической ткани, изменяющей уровни miRNA в крови у пациентов с СД 2 типа. Хорошо известно, что ткани животных и человека могут выделять внутриклеточные микроРНК в кровотоки [78]. При имплантации клеток человеческой опухоли мышам, специфические человеческие опухолевые miRNAs были обнаружены в плазме [60], в то время как циркулирующие miRNAs, полученные из миокарда, могут быть полезны в качестве потенциальных биомаркеров для инфаркта [59]. Циркулирующие микроРНК могут обеспечить комплексное представление о метаболическом профиле

пациентов с СД 2 типа, поскольку все чувствительные к инсулину ткани выделяют упакованную в микровезикулы микроРНК в кровь [78, 217, 218]. У крыс с экспериментальным СД 2 типа (тучные животные с высоким содержанием жиров, получавшие стрептозотоцин) профиль miRNA крови был схож к таковым из чувствительных к инсулину тканей крысы (скелетных мышц, жировой ткани и печени) и поджелудочной железы [136]. Кроме того, большинство изменений miRNA, обнаруженных в этих тканях, участвующих в пути передачи сигналов инсулина, были также обнаружены в профиле miRNA крови [136]. Таким образом, снижение или повышение экспрессии miR-155 в чувствительных к инсулину тканях (то есть в печени, жировой ткани и скелетных мышцах) может вызывать такое же снижение или повышение уровня miR-155 в крови у пациентов с диабетом. В исследовании Lin X. и соавт. (2016), у мышей избыточная экспрессия miR-155 приводила к гипогликемии, улучшению толерантности к глюкозе и повышению чувствительности к инсулину периферических тканей, тогда как у мышей, у которых отсутствует miR-155, развивалась гипергликемия, резистентность к глюкозе и инсулину, что свидетельствует о благоприятной регуляторной роли miR-155 в гомеостазе глюкозы [176].

1.4.3.6. МикроРНК -375

Ген предшественника miR-375 у человека локализуется на 2 хромосоме (chr2: 219001645-219001708 [-]).

miR-375 была идентифицирована как специфичная для островков поджелудочной железы miRNA, регулирующая секрецию инсулина [183]. Последующие исследования показали, что miR-375 участвует во множественных биологических процессах, включая гомеостаз глюкозы, иммунитет слизистой оболочки и развитие рака [84, 185, 263]. Более того, miR-375 значительно подавляется в некоторых типах опухолей, а также ингибирует их пролиферацию путем нацеливания на некоторые важные

гены, например, JAK2, YAP1 и PDK1 [163, 181, 182]. Исследования показали, что miR-375 является негативным регулятором адипогенной дифференцировки путем влияния на рецептор морфогенетического белка кости 2 (BMP2) [184]. Остеобластные и адипоцитарные линии имеют альтернативные судьбы во время развития и старения, и повышенный адипогенез коррелирует с уменьшением остеогенеза [23, 232], что приводит к предположению, что miR-375 может играть роль в дифференциация стволовых клеток в направлении остеогенного происхождения. Piran M. и соавторы (2017) в своем исследовании показали увеличение экспрессии miR-375 в ASC у пациентов с сахарным диабетом 2 типа [110]. Chen S. и соавт. (2017) обнаружили, что miR-375 не изменяется во время остеогенной дифференцировки hASC (human adipose-derived mesenchymal stem cells), а избыточная экспрессия miR-375 способствует остеогенезу hASC как *in vitro*, так и *in vivo* [208]. Liu S. и соавт (2017) также подтвердили эту гипотезу на культуре свиных преадипоцитов [235]. Это не согласуется с предыдущим сообщением, в котором указывалось, что miR-375 оказывал негативное регуляторное влияние на остеогенную дифференцировку клеток C2C12 (клетки мышечной мышечной ткани) [161]. Это различие может быть связано с клеточными линиями, использованными этих в двух исследованиях. Клетки C2C12 были выделены из миобластов мыши и не обладали потенциалом множественной дифференцировки, в то время как hASC, были получены из жировой ткани человека и способны к дифференцировке по нескольким линиям [101].

Однако, в своем исследовании, Ling H. Y. и соавт. (2011) обнаружили, что экспрессия miR-375 увеличилась после индукции адипогенной дифференцировки 3T3-L1 преадипоцитов. Экспрессия miR-375 увеличивала уровни мРНК как C / EBP α (белка, связывающего CCAAT / энхансер α), так и PPAR γ , а также индукцию жирных кислот адипоцитов, накопление связывающего белка (aP2) и триглицеридов (TG). Напротив, anti-miR-375

повышал уровни фосфорилирования ERK1/2 и ингибировал экспрессию мРНК C/EBP α , PPAR γ 2 и aP2 в адипоцитах 3T3-L1, что сопровождалось снижением дифференцировки адипоцитов [162]. Несколько исследователей сообщили о роли ERK1/2 в регуляции жировой ткани, но эти выводы были спорными. В некоторых исследованиях сообщалось, что активация ERK1/2 различными эффекторами блокировала адипогенез [107, 210], тогда как в других указывалось на необходимость быстрой временной активации ERK для клональной экспансии или дифференцировки адипоцитов [20, 45]. Чтобы объяснить эти явно противоречивые результаты активации ERK при адипогенезе, было высказано предположение, что активация ERK может иметь противоположные эффекты во время адипогенеза. В начале дифференцировки адипоцитов ERK необходимо активировать для пролиферации, но позже при дифференцировке адипоцитов ERK необходимо отключать для предотвращения фосфорилирования PPAR γ [247]. Таким образом, вероятно, что активация ERK строго и временно контролируется, поскольку при определенных условиях активность ERK может потребоваться для дифференцировки адипоцитов, тогда как в других условиях активность ERK может нарушать их дифференцировку. Данные Ling H. Y. и соавт. (2011), подтверждают мнение о том, что путь ERK1/2 играет отрицательную роль в дифференцировке адипоцитов 3T3-L1, который опосредуется miR-375. Кроме того, нижестоящие мишени пути ERK также регулируются miR-375 [162]. Было показано, что PPAR γ 2, ключевой адипогенный фактор транскрипции, негативно регулируется ERK [47; 43]. Уровни белка и мРНК PPAR γ 2 были значительно повышены в адипоцитах со сверхэкспрессией miR-375 по сравнению с таковыми в адипоцитах, стабильно экспрессирующих pNeg (Empty pSilencerTM3.1-H1 вектор был использован в качестве негативного контроля). Кроме того, уровни белка и мРНК aP2, одного из генов-мишеней для PPAR γ 2,4, также были повышены в группе со сверхэкспрессией miR-375. Напротив, обработка олиго-анти-miR-375

значительно ингибировала экспрессию белка PPAR γ 2 и aP2 в этих клетках [162]. Взятые вместе, эти данные позволяют предположить, что повышенная экспрессия PPAR γ 2 и aP2 может быть связана с высвобождением ингибирующих эффектов на PPAR γ 2 с помощью ERK, активация которого подавляется miR-375. Точные молекулярные механизмы, с помощью которых активация ERK может подавлять экспрессию PPAR γ 2, еще предстоит определить.

Мыши, нокаутированные по miR-375, являются нормоинсулинемическими, но гипергликемическими. У этих мышей также наблюдается увеличение количества панкреатических α -клеток, а также уровень глюкагона натощак и питающихся плазмой [183]. Повышение уровня глюкагона в плазме приводит к значительному увеличению экспрессии G6PC (glucose-6-phosphatase) и PCK1 (Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1) и продукции глюкозы в печени. miR-375 также регулирует экспрессию кластера генов, контролирующих клеточный рост и пролиферацию, включая кавеолин-1 (Cav-1), ингибитор связывания ДНК 3 (Id3), Ras-дексометазон-индуцированный-1 (Rasd1) и человека антиген D / эмбриональный летальный аномальный зрительный 4 (HuD/Elavl4) [183]. HuD/Elavl4 является РНК-связывающим белком, который регулирует трансляцию препроинсулина (Ins2) и выработку инсулина [214]. Эти открытия указывают на то, что снижение секреции инсулина, наблюдаемое в β -клетках поджелудочной железы у нокаутированных по miR-375 мышей, может быть связано с повышенной экспрессией HuD в β -клетках поджелудочной железы. Более того, miR-375 нацелен на миотрофин (Mtpn), ген, участвующий в деполимеризации актина и обмене внеклеточных везикул, тем самым уменьшая экзоцитоз инсулина [183].

Higuchi С. и соавт. (2015) продемонстрировали достоверное повышение miR-375 в сыворотке больных сахарным диабетом 2 типа [103]. García-Jacobo R. с коллегами (2019) наблюдали увеличение относительной экспрессии

циркулирующей miR-375 у пациентов с СД 2 типа с плохим гликемическим контролем, в то время как снижение miR-375 было отмечено у пациентов с СД 2 типа с нефропатией и диабетической стопой. Относительная экспрессия miR-375 коррелировала с уровнями холестерина и липопротеинов низкой плотности [64].

Глава 2

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Настоящее исследование одобрено Этическим комитетом ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России. Исследования проводились на базе клиники и поликлиники ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России (главный врач – доцент, доктор медицинских наук Д.В. Федерякин). Клиническая часть исследования выполнялась в клинике университета: консультация эндокринолога (доцент, кандидат медицинских наук М.Б. Лясникова), забор образцов крови и жировой ткани – в хирургическом отделении (заведующий отделением – врач высшей квалификационной категории А.Д. Сухов). Лабораторная часть исследования – биохимические, иммуноферментные и молекулярно-генетические – выполнялась диссертантом М.А. Тофило, врачом клинической лабораторной диагностики и лабораторным генетиком, и проводилась на базе биохимического и молекулярно-биологического отделов клинико-диагностической лаборатории поликлиники (заведующая – врач-лаборант высшей квалификационной категории М.А. Горшкова).

2.1. 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)), а также с ожирением и сахарным диабетом 2 типа (СД 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 в анамнезе, наличие тяжелых соматических заболеваний (сердечно-сосудистой, легочной патологии, сахарного диабета 1 типа и других нарушений обмена).

Настоящая работа является наблюдательным (наблюдательным), «случай-контроль» исследованием.

2.2. Характеристика обследованных групп

В исследование было включено 56 женщин, 46 из них составили основную группу (метаболически компрометированные) и 10 пациенток – контрольную группу (метаболически некомпрометированные).

2.2.1. Характеристика основной группы пациентов

Основную группу метаболически компрометированных пациентов составили женщины 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 – нарушенную толерантность к глюкозе (инсулинорезистентность (ИР)), и 10 человек ($57,0 \pm 2,3$ лет; $p > 0,05$) – СД 2 типа. Женщины обеих подгрупп – ИР и СД 2 типа – были сопоставимы по возрасту между собой и с группой в целом (все $p > 0,05$). Все пациентки полностью соответствовали критериям включения и исключения в данное исследование.

2.2.2. Характеристика контрольной группы пациентов

Контрольную группу (группу сравнения) составили 10 человек с нормальной массой тела и отсутствием лабораторных признаков нарушений углеводного обмена, 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.

2.3. Антропометрические исследования

Пациентам всех групп проводили измерение массы тела при помощи медицинских весов и роста при помощи ростомера.

Индекс массы тела рассчитывался по формуле 1:

$$\text{ИМТ} = M / P^2, \quad (1)$$

где ИМТ - индекс массы тела, М - масса тела в кг, Р – рост в метрах.

Для оценки распределения жировой ткани всем пациентом при помощи сантиметровой ленты измеряли окружность талии на уровне гребней подвздошных костей и окружность бедер на уровне тазобедренных суставов. Далее проводили расчет отношений окружности талии к окружности бедер (ОТ/ОБ).

Согласно клиническим рекомендациям по ожирению ИМТ учитывался как нормальный при его значении от 18,5 до 24,9; избыточная масса тела диагностировалась при ИМТ от 25,0 до 29,9; ожирение I степени — 30-34,9; ожирение II степени — 35-39,9; ожирение III степени — более 40. Окружность талии (ОТ) у женщин более 80 см являлась диагностическим критерием абдоминального ожирения. Отношение окружности талии к окружности бедер больше 0,8 принималось за абдоминальное ожирение [8].

2.4. Лабораторные исследования

2.4.1. Получение материала для биохимических исследований

Взятие крови для исследования у пациентов проводили путём венепункции локтевой вены утром натощак в условиях процедурного кабинета клиничко-диагностической лаборатории клиники ФГБОУ ВО Тверского ГМУ МЗ РФ. Для получения сыворотки 4 мл крови забирали в 2 вакуумные пробирки для сыворотки с активатором свертывания «Vacuette»

(Greiner Bio-one, Австрия). После свертывания крови её центрифугировали 10 минут при 1500 g. 10 минут. Затем отбирали сыворотку крови и использовали её для проведения тестов. Сыворотка крови забиралась за день до операции при поступлении пациента в стационар. Образцы крови для определения СРБ у пациенток получали через 14 дней после проведенной операции. Биохимические и иммуноферментные исследования выполняли в день получения образцов крови.

2.4.2. Биохимические исследования

2.4.2.1. Определение уровня гликемии

Определение концентрации глюкозы сыворотки крови натощак проводили глюкозоксидазным методом с использованием автоматического биохимического анализатора «Vitalab Flexor XL» (ELITech Group Vital, Франция) и набора для определения концентрации глюкозы сыворотки крови глюкозы 10x50 мл (BioSystems, Испания) согласно инструкции производителя. Результаты 3,33 – 6,10 ммоль/л учитывались как нормальные [7].

2.4.2.2. Проведение орального глюкозотолерантного теста (ОГТТ)

Пероральный глюкозотолерантный тест проводили утром на фоне не менее чем 3-дневного неограниченного питания (более 150 г углеводов в сутки) и обычной физической активности. Тесту предшествовало ночное голодание в течение 8-14 часов. Последний вечерний прием пищи содержал 30-50 г углеводов. После взятия крови натощак пациент выпивал 75 г безводной глюкозы, растворенной в 250-300 мл воды. Через 2 часа осуществляли повторное взятие крови [10].

Измерение концентрации глюкозы сыворотки крови проводилось с использованием автоматического биохимического анализатора «Vitalab Flexor XL» (ELITech Group Vital, Франция) и набора для определения

концентрации глюкозы сыворотки крови глюкозы 10x50 мл (BioSystems, Испания) согласно инструкции производителя.

Показатели, не превышающие натощак 6,1 ммоль/л и через 2 часа после углеводной нагрузки 7,8 ммоль/л, считались референсными. Превышение концентрации глюкозы натощак до 7,0 ммоль/л при нормальных значениях через 2 часа после нагрузки учитывались как нарушение гликемии натощак. Нарушенная толерантность к глюкозе диагностировалась при повышении гликемии натощак до 7,0 ммоль/л и при концентрации глюкозы через 2 часа после углеводной нагрузки $\geq 7,8$ и $< 11,1$ ммоль/л [7].

2.4.2.3. Определение уровня HbA1c

Для определения уровня гликированного гемоглобина в сыворотке крови использовали анализатор-рефлектометр «Nycocard Reader II» (Axis-Shield, Норвегия) и набор реактивов «Nycocard HbA1c» (Abbott Diagnostics Technologies AS, США). Результаты, находящиеся в пределах 3-6%, учитывали, как нормальные, более 6,1% – как наличие хронической гипергликемии в предшествующие три месяца [7].

2.4.2.4. Индексы инсулинорезистентности

Для оценки адекватности чувствительности тканей к инсулину использовали индексы инсулинорезистентности HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment) и Caro-IR, причем образцы крови для анализа брали из вены после 14 часов голодания, единицами измерения данных индексом являются баллы [10]. Индекс инсулинорезистентности HOMA-IR рассчитывали по формуле 2:

$$\text{HOMA-IR} = \text{Инсулин натощак (мкЕд/мл)} \times \text{глюкоза натощак (ммоль/л)} / 22,5 \quad (2)$$

За нормальное значение индекса HOMA-IR принимали показатель менее 2,77, при индексе более 2,77 регистрировали инсулинорезистентность.

Индекс инсулинорезистентности Caro-IR представляет собой отношение концентрации глюкозы натощак (ммоль/л) к базальной концентрации инсулина (мкЕд/мл). Пороговым значением индекса Caro-IR является 0,33, если индекс пациента более, то регистрировали нормальную чувствительность тканей к инсулину, а если менее – инсулинорезистентность.

2.4.2.5. Липидный спектр сыворотки крови

Для характеристики липидного спектра сыворотки крови измеряли концентрации общего холестерина (ОХС), триглицеридов (ТГ), холестерина липопротеинов высокой плотности (ХС ЛПВП) и рассчитывали концентрацию холестерина липопротеинов низкой плотности (ХС ЛПНП), очень низкой плотности (ХС ЛПОНП) и коэффициент атерогенности (КА). Концентрации ОХС, ЛПВП, ТГ определяли энзиматическим колориметрическим методом, применяя наборы реагентов «CHOL», «HDL-CHOL», «TG» (Analyticon, Германия). Исследование проводили с применением автоматического биохимического анализатора «Flexor E» (VITAL SCIENTIFIC B.V., Нидерланды).

Концентрацию ЛПОНП рассчитывали, как частное деления концентрации ТГ на коэффициент 2,2. Уровень ЛПНП находили как разность между концентрациями ОХС и суммой ЛПВП и ЛПОНП.

В клинической практике оценивают не только абсолютное значение концентраций атерогенных (ЛПОНП и ЛПНП) и антиатерогенных (ЛПВП) липопротеидов, но и их соотношение, которое называется коэффициентом атерогенности (КА) и рассчитывается по формуле 3:

$$\text{КА, ед.} = (\text{ОХС} - \text{ХС ЛПВП}) / \text{ХС ЛПВП} \quad (3)$$

В норме соотношение не должно превышать 4,0 ед. Индекс атерогенности выше 4,0 ед. указывает на высокий риск развития атеросклероза.

2.4.2.6. Определение уровня инсулина

Количественное определение инсулина в сыворотке крови проводили методом иммуноферментного анализа (ИФА), используя тест-систему «Insulin Test System AccuBind® ELISA Microwells» (Monobind Inc., США), согласно инструкции производителя. Оптическую плотность (ОП) содержимого лунок микропланшета измеряли с помощью микропланшетного мультidetектора (ридера) «Zenith 1100» (Anthos, Австрия) при длине волны 450 нм. Концентрация инсулина в образце прямопропорциональна оптической плотности содержимого лунки, в которую он был внесен. Концентрацию инсулина в образцах определяли автоматически по калибровочной кривой, построенной по 6 калибраторам (стандартным растворам) инсулина программным обеспечением прибора, и выражали в микроединицах на миллилитр (мкЕД/мл). В норме содержание инсулина в крови взрослых лиц составляет 0,7-9,0 мкЕД/мл, у больных СД 2 типа – 0,7-25 мкЕД/мл.

2.4.2.7. Определение концентрации лептина

Концентрацию лептина в сыворотке крови определяли методом ИФА, применяли тест-систему «Leptin ELISA» (Monobind DBC Inc., Канада), следуя инструкции фирмы-производителя. Детекцию ОП лунок микропланшета проводили, используя микропланшетный мультidetектор (ридер) «Zenith 1100» (Anthos, Австрия) при длине волны 450 нм. Уровни лептина в сыворотке крови определялись программным обеспечением прибора по калибровочной кривой, построенной по 7 калибраторам (стандартным растворам) лептина, и выражались в нанogramмах на миллилитр (нг/мл). Референсный интервал лептина в крови женщин – 3,7-17,0 нг/мл.

2.4.2.8. Определение адипонектина

Для измерения уровня адипонектина в сыворотке крови методом ИФА использовали набор реагентов «Adiponectin ELISA» (Mediadiagnost GmbH.,

Германия). При выполнении методики строго следовали инструкции к этой тест-системе. ОП лунок микропланшета измеряли при длине волны 450 нм микропланшетным мультidetектором «Zenith 1100» (Anthos, Австрия). Калибровочная кривая зависимости концентрации от ОП строилась программным обеспечением по 6 калибраторам (стандартным растворам) адипонектина. Содержание адипонектина в образцах сыворотки крови выражали в микрограммах на миллилитр (нг/мл). Интервал нормальных концентраций адипонектина в крови у женщин – 4,0-19,4 мкг/мл.

2.4.2.9. Определение уровня С-реактивного белка

Образцы крови для определения С-реактивного белка (СРБ) у пациенток получали через 14 дней после проведенной операции.

Количественное определение С-реактивного белка в сыворотке крови выполняли с помощью «сэндвич»-методики ИФА с аналитической чувствительностью 0,05 мг/л, называемый hsCRP (high sensitive C-reactive protein). Принцип методики состоит в том, что СРБ в стандартах, контроле и образцах связывается со специфическими антителами, которые сорбированы в лунках микропланшета. Добавляемый конъюгат анти-СРБ-антител и пероксидазы хрена связывается с молекулами СРБ, захваченными первыми антителами, образуя «сэндвич»-комплекс. После инкубации выполняется промывка лунок для удаления несвязавшихся компонентов. Затем в лунки вносится субстратный раствор, содержащий тетраметилбензидин, что вызывает развитие голубого окрашивания. Ферментативную реакцию останавливают внесением стоп-раствора (серной кислоты), при этом цвет раствора меняется на желтый. Интенсивность окрашивания (оптическая плотность) реакционной смеси в лунках измеряли с помощью микропланшетного мультidetектора «Zenith 1100» (Anthos, Австрия) при длине волны 450 нм и прямо пропорциональна содержанию СРБ в образце. В работе использовали набор «С-реактивный белок, высокочувствительный (hsCRP ELISA)» для количественного определения СРБ с помощью ИФА

производства Biomerica, Inc., США. Концентрацию СРБ в образцах выражали в миллиграммах на литр (мг/л), нормальной концентрацией считали уровень, не превышающий 5,0 мг/л.

2.4.2.10. Определение концентрации свободных жирных кислот

Определение концентрации свободных жирных кислот (СЖК) сыворотки крови проводили с использованием автоматического биохимического анализатора «Vitalab Flexor XL» (ELITech Group Vital, Франция) и набора реагентов для определения свободных жирных кислот «NEFA FS (Non-esterified fatty acids fluid stable)», производства DiaSys Diagnostic Systems GmbH (Германия) согласно инструкции. Референсный интервал СЖК для женщин – 0,10-0,45 ммоль/л.

2.5. Молекулярно-генетические исследования

2.5.1. Получение, транспортировка и хранение материала

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 помещался в пробирку типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл с 0,5 мл стабилизирующего реагента «RNAlater RNA Stabilization Reagent» (Qiagen GmbH, Германия). Пробирки помещались в термоконтейнер с хладагентами и транспортировались в клинично-диагностическую лабораторию клиники ФГБОУ ВО Тверской ГМУ МЗ РФ, где хранились в морозильной камере при -80°C. Постановку ПЦР всех образцов висцерального жира выполняли одновременно.

Венозная кровь забиралась в условиях процедурного кабинета клинично-диагностической лаборатории клиники ФГБОУ ВО Тверского ГМУ МЗ РФ, в вакуумную пробирку с активатором свертывания «Vacuette» (Greiner Bio-one, Австрия). После взятия пробирку центрифугировали при 1300g в течение 10 минут, сыворотку отбирали в пробирку типа

«Эппендорф» объемом 2 мл и помещали на хранение в морозильную камеру при -80°C . Постановку ПЦР всех образцов сывороток выполняли одновременно.

2.5.2. Выделение микроРНК из жировой ткани

Выделение микроРНК из жировой ткани, стабилизированной в «RNAlater RNA Stabilization Reagent» (Qiagen GmbH, Германия), осуществляли согласно протоколу «Supplementary Protocol: Isolation of total RNA, including small RNAs, from plant and tissues» (Qiagen GmbH, Германия). При этом, сначала образцы помещали в пробирки с шариками для гомогенизации мягких тканей «Precellys Lysing Kit» (Bertin Instruments, Франция) и гомогенизировали при помощи лизирующего реактива «QIAzol Lysis Reagent» (Qiagen GmbH, Германия) в гомогенизаторе «Minilys» (Bertin Instruments, Франция). Затем выделение микроРНК проводили колоночным методом хлороформ-экстракции при помощи набора «miRNeasy Mini Kit» (Qiagen GmbH, Германия), а также 95% этанола и хлороформа. Концентрацию выделенной микроРНК измеряли на спектрофотометре «NanoDrop™ Lite» (Thermo Fisher Scientific, США).

2.5.3. Выделение микроРНК из сыворотки крови

Выделение микроРНК из сыворотки крови осуществляли согласно протоколу «miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit Protocol» (Qiagen GmbH, Германия). Для этого использовали колоночный метод выделения и осаждения РНК изопропанолом при помощи набора «miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit» (Qiagen GmbH, Германия). Концентрацию выделенной микроРНК измеряли на спектрофотометре «NanoDrop™ Lite» (Thermo Fisher Scientific, США).

2.5.4. Постановка реакции обратной транскрипции

Постановка реакции обратной транскрипции (ОТ) осуществлялась по протоколу «TaqMan® Small RNA Assays» при помощи набора «TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit» (Thermo Fisher Scientific, США) а также

ОТ праймеров к исследуемым микроРНК «TaqMan® MicroRNA Assay» (Thermo Fisher Scientific, США). Реакцию обратной транскрипции проводили в амплификаторе «Veriti Thermal Cycler» (Thermo Fisher Scientific, США).

2.5.5. Постановка ПЦР в режиме реального времени

Постановка ПЦР в режиме реального времени осуществлялась согласно протоколу «TaqMan® Small RNA Assays» при помощи набора для проведения ПЦР в режиме реального времени «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). Реакция амплификации проводилась в амплификаторе с детекцией в режиме реального времени «ДТ-Лайт» (ДНК-технология, Россия).

2.5.6. Анализ полученных результатов ПЦР

Анализ результатов ПЦР начинали с визуальной оценки полученных амплификационных кривых. Затем для каждого образца полученные значения C_t – 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 проводился трижды, поэтому сначала определялось среднее значение C_t исследуемых микроРНК и RNU6B. RNU6B относится к генам «домашнего хозяйства» (англ. *housekeeping genes*), необходимым для поддержания важнейших жизненных функций организма, которые экспрессируются практически во всех тканях и клетках на относительно постоянном уровне (гены общеклеточных функций). Экспрессия микроРНК является относительной переменной, поэтому нормализация полученных данных осуществлялась с использованием эндогенного котроля RNU6B для каждого образца. Уровень экспрессии в группах сравнения определялся относительно контрольной группы методом $2^{-\Delta\Delta C_t}$ [126].

Первый этап вычислений – нормализация полученных значений Ct каждой исследуемой микроРНК рассчитывалась по формуле 4:

$$\Delta Ct = Ct_{miR_x} - Ct_{RNU6B}, \quad (4)$$

где Ct_{miR_x} – пороговый цикл исследуемой микроРНК, Ct_{RNU6B} – пороговый цикл эндогенного контроля.

Вторым этапом было определение уровня экспрессии исследуемой микроРНК каждого пациента относительно среднего значения одноименной микроРНК контрольной группы пациентов, рассчитаного по формуле 5:

$$\Delta \Delta Ct = \Delta Ct_{miR_{xA}} - \Delta Ct_{miR_{xB}}, \quad (5)$$

где $\Delta Ct_{miR_{xA}}$ – нормализованная экспрессия микроРНК каждого пациента в исследуемой группе, $\Delta Ct_{miR_{xB}}$ – средняя нормализованная экспрессия микроРНК в контрольной группе.

Третим этапом было вычисление $2^{-\Delta \Delta Ct}$ – уровня экспрессии определенной микроРНК для каждого пациента. Согласно данной формуле уровень экспрессии микроРНК у лиц контрольной группы был равен единице. При этом, если среднее значение $2^{-\Delta \Delta Ct}$ микроРНК в исследуемой группе превышало 1, то уровень ее экспрессии был кратно выше, чем в контрольной группе. Тогда как, если среднее значение $2^{-\Delta \Delta Ct}$ микроРНК в исследуемой группе было меньше 1, то уровень ее экспрессии был ниже, чем в контрольной группе.

2.6. Методы статистического анализа

Для сбора и хранения полученных в настоящем исследовании результатов была создана компьютерная база данных в программе Microsoft® Office® Excel® 2016 (Microsoft Corporation, Tulsa, USA). Статистическую обработку данных исследования выполняли с помощью IBM® SPSS® Statistics 23.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA).

Величины необходимых размеров выборок определены при помощи модулей Sample Size программ COMPARE 3.85 и DESCRIBE 3.18 пакета WinPEPI 11.65 (JHAmbramson) для минимально значимых различий и величин переменных, полученных в пилотные исследования и из литературных данных, пороговой величине доверительной вероятности равной 5% и пороговой статистической мощности 80%.

Результаты представлены в виде среднего арифметического значения и стандартного отклонения ($\bar{X} \pm SD$), среднего арифметического значения и стандартной ошибки среднего ($\bar{X} \pm SE$), медианы, первого и третьего квартилей (Me [Q₁; Q₃]).

Анализ количественных признаков начинали с оценки их распределения, для чего вычислялись показатели асимметрии и эксцесса вариационного ряда. Если значение асимметрии и эксцесса по абсолютной величине не превышало 1, то распределение признака признавалось близким к нормальному и для его анализа использовались параметрические критерии. В противном случае распределение признака считалось отличающимся от нормального и анализировалось с помощью непараметрических критериев.

Для оценки статистической значимости разности средних в двух группах при нормальном распределении признака использовался t-критерий Стьюдента для независимых вариантов, при отличающемся от нормального распределении – критерий Манна-Уитни.

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 с нормальным распределением оценивалась с помощью коэффициента корреляции Пирсона,

при распределении, отличающемся от нормального – путем расчета коэффициента корреляции рангов Спирмена.

Глава 3

КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫЕ ПРОЯВЛЕНИЯ АЛИМЕНТАРНО- КОНСТИТУЦИОНАЛЬНОГО ОЖИРЕНИЯ И ИНСУЛИНОРЕЗИСТЕНТНОСТИ У ОБСЛЕДОВАННЫХ ЖЕНЩИН (Результаты собственных исследований)

В основу настоящего исследования положено сравнение результатов обследования пациентов в зависимости от наличия и выраженности ожирения и инсулинорезистентности. В данной главе представлены данные, свидетельствующие о том, что определение уровней экспрессии микроРНК действительно проведено у больных, различающихся по тяжести метаболических расстройств.

1.1. Характеристика обследованных женщин по возрасту и антропометрическим показателям

Основную группу метаболически компрометированных пациентов составили женщины с алиментарно-конституциональным ожирением, средний возраст которых составил $55,0 \pm 1,4$ лет (таблица 1). Из них 36 женщин ($54,0 \pm 1,7$ лет) имели лабораторные признаки нарушений углеводного обмена – нарушенную толерантность к глюкозе (НТГ), т.е. инсулинорезистентность, и 10 человек ($57,0 \pm 2,3$ лет; $p > 0,05$) – сахарный диабет 2 типа (СД 2 типа). Женщины обеих подгрупп – НТГ и СД 2 типа – были сопоставимы по возрасту между собой и с группой в целом (все $p > 0,05$).

Контрольную группу (группу сравнения) составили 10 человек с нормальной массой тела и отсутствием лабораторных признаков нарушений углеводного обмена, 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 (таблица 1).

Таблица 1 – Средний возраст обследованных лиц ($\bar{X} \pm SD$)

Показатели	Метаболически некомпромети- рованные, n=10	Метаболически компрометированные			<i>p</i>
		больные с ожирением и ИР, n=36	больные с ожирением и СД 2 типа, n=10	Всего, n=46	
Возраст, лет	51,7±10,8	53,6±9,9	57,0±7,0	55,0±9,42	–

Примечание (здесь и далее в главе 3) – p_1 – достоверность различий между пациентами с ИР и СД 2 типа, p_2 – достоверность различий между пациентами с ИР и контрольной группой, p_3 – достоверность различий между пациентами с СД 2 типа и контрольной группой, p_4 – достоверность различий между всеми метаболически компрометированными пациентами и контрольной группой, $p < 0,05$

Результаты измерения роста пациенток показали (таблица 2), что различия по данному параметру между лицами контрольной и основной группы в целом, а также ее подгруппами, отсутствовали ($p > 0,05$).

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

Таблица 2 – Антропометрические данные пациентов ($\bar{X} \pm SD$)

Показатели	Метаболически некомпрометированные, n=10	Метаболически компрометированные			<i>p</i>
		больные с ожирением и ИР, n=36	больные с ожирением и СД 2 типа, n=10	Всего, n=46	
Рост, см	164,0±8	164,6±5,2	160±7,3	164,3±5,7	–
Вес, кг	63,5±8,1	98,5±13,1	90,8±11,6	96,8±13,1	<i>p</i> ₂ , <i>p</i> ₃ , <i>p</i> ₄
ИМТ, кг/м ²	23,5±2,13	36,3±4,13	34,1±4,64	35,8±4,29	<i>p</i> ₂ , <i>p</i> ₃ , <i>p</i> ₄
Окружность талии (ОТ), см	79,7±5,5	101,4±11,76	103,5±9,22	101,84±11,2	<i>p</i> ₂ , <i>p</i> ₃ , <i>p</i> ₄
Окружность бедер (ОБ), см	98,3±2,19	113,2±10,2	113,4±8,28	113,2±9,73	<i>p</i> ₂ , <i>p</i> ₃ , <i>p</i> ₄
ОТ/ОБ, ед.	0,81±0,07	0,89±0,04	0,91±0,03	0,88±0,04	<i>p</i> ₂ , <i>p</i> ₃ , <i>p</i> ₄
Степень ожирения, степень	0±0,00	1,8±0,13	1,3±0,21	1,7±0,11	<i>p</i> ₂ , <i>p</i> ₃ , <i>p</i> ₄

3.2. Характеристика показателей углеводного обмена

Группа пациентов с ожирением в целом, так и обе подгруппы – с ИР и с СД 2 типа – достоверно отличались по изученным показателям углеводного обмена от лиц контрольной группы (таблица 3). Причем нарушение

показателей углеводного обмена в группе больных СД 2 типа было статистически более значимым по сравнению с группой пациентов с ИР, за исключением уровня инсулина ($p_1 > 0,05$).

Таблица 3 – Гликемический статус пациентов ($\bar{X} \pm SD$)

Показатели	Метаболически некомпromетированные, n=10	Метаболически компromетированные			p
		больные с ожирением и ИР, n=36	больные с ожирением и СД 2 типа, n=10	Всего, n=46	
Глюкоза, ммоль/л	5,3±0,32	6,00±0,33	7,2±0,20	6,3±0,61	p_1, p_2, p_3, p_4
ОГТТ через 2 часа, ммоль/л	5,41±0,38	8,31±1,14	11,3±1,23	8,96±1,68	p_1, p_2, p_3, p_4
HbA1c, %	5,1±0,20	5,8±0,38	6,4±0,59	5,96±0,59	p_1, p_2, p_3, p_4
Инсулин, мкЕД/мл	7,4±1,8	19,3±5,97	21,12±9	19,45±6,7	p_2, p_3, p_4

Уровень гликемии натощак у лиц группы контроля был в пределах референсного интервала (3,5–6,0 ммоль/л) и в среднем составил 5,3±0,31 ммоль/л. У пациенток с ожирением, как в целом по группе, так и в подгруппах, и с ИР, и с СД 2 типа концентрация глюкозы в сыворотке крови натощак была достоверно выше, чем у метаболически некомпromетированных женщин. Между больными с ожирением подгрупп с ИР и СД 2 типа выявлено статистически значимое различие, несмотря на

диспансерное наблюдение у эндокринолога и получаемое лечение последними.

Проведение орального глюкозотолерантного теста (ОГТТ) подтвердило адекватность деления женщин, включенных в исследование на группы и подгруппы. Так, через 2 часа после приема раствора глюкозы уровень гликемии у всех больных с ожирением составил $8,96 \pm 0,25$ ммоль/л, в подгруппах с ИР и с СД 2 типа – $8,31 \pm 0,19$ и $11,3 \pm 0,39$ ммоль/л соответственно, при снижении у лиц контрольной группы до нормальных значений – $5,41 \pm 0,12$ ммоль/л.

Определение концентрации гликированного гемоглобина (HbA1c), характеризующего наличие гипергликемии в предыдущие 3 месяца, показало превышение верхней границы референсного интервала (6%) только в подгруппе пациенток с ожирением и СД 2 типа. Статистический анализ выявил достоверные различия уровней HbA1c в крови между всеми сравниваемыми парами групп и подгрупп.

Уровень инсулинемии в контрольной группе и группе метаболически компрометированных пациенток находился в пределах референсного интервала (3,0–22,0 мкЕД/мл). В группе больных с ожирением в целом он был в 2,6 раза выше, чем у лиц контрольной группы, а в подгруппах с ИР – в 2,6 раз и с СД 2 типа – в 2,9 раз выше соответственно. При этом различий концентраций инсулина в крови между подгруппами пациенток с ожирением не выявлено.

На основе полученных результатов оценки углеводного обмена пациенток были рассчитаны индексы, характеризующие их чувствительность к инсулину (таблица 4).

У пациентов контрольной группы значения индексов HOMA-IR и Caro-IR соответствовали референсным (HOMA-IR < 2,77), Caro-IR (> 0,33), следовательно, чувствительность тканей к инсулину у них была адекватной.

У всех больных с ожирением индекс НОМА-IR превышал пороговое значение и по сравнению с контрольной группой был выше в среднем в 3,2 раза, в подгруппах с ИР и СД 2 типа – в 2,9 и 4,1 раз соответственно.

Таблица 4 – Характеристика инсулинорезистентности пациентов ($\bar{X} \pm SD$)

Показатели	Метаболически некомпро- мети- рованные, n=10	Метаболически компрометированные			<i>p</i>
		больные с ожирением и ИР, n=36	больные с ожирением и СД 2 типа, n=10	Всего, n=46	
Индекс НОМА-IR, балл	1,74±0,46	5,1±1,66	7,11±3,01	5,5±0,27	<i>p</i> _{1, p} _{2, p} _{3, p} ₄
Индекс Саго-IR, балл	0,75±0,23	0,34±0,09	0,5±0,46	0,38±0,03	<i>p</i> _{1, p} _{2, p} _{3, p} ₄

Индекс Саго-IR у пациентов основной группы в целом и ее подгрупп был выше порогового. Однако по сравнению с метаболически некомпromетированными лицами данный индекс был ниже в среднем в 1,9 раза у всех страдающих ожирением, в 2,2 и 1,5 раз – в подгруппах с ИР и СД 2 типа.

Таким образом, установлено, что лица контрольной группы и основной группы (и ее подгрупп) отличались друг от друга по чувствительности тканей к инсулину. Причем более показательным в этом плане проявил себя индекс инсулинорезистентности НОМА-IR.

3.3. Характеристика показателей липидного обмена

Во всех обследованных группах концентрации общего холестерина (ОХС) в крови были повышены по сравнению с референсным значением (5,17 ммоль/л), причем это превышение было статистически значимым как в группе метаболически компрометированных лиц в целом, так и в ее подгруппах (таблица 5). По сравнению с контрольной группой больных уровень ОХС был достоверно повышен у всех пациентов основной группы и подгруппы с СД 2 типа. Среди лиц с ожирением концентрация ОХС в подгруппе с СД 2 типа была достоверно выше, чем в подгруппе с ИР.

Таблица 5 – Липидный спектр крови пациентов ($\bar{X} \pm SD$)

Показатели	Метаболически некомпрометированные, n=10	Метаболически компрометированные			<i>p</i>
		больные с ожирением и ИР, n=36	больные с ожирением и СД 2 типа, n=10	Всего, n=46	
ОХС, ммоль/л	5,47±0,51	6,56±0,86	7,2±0,38	6,88±0,9	<i>p</i> _{1, p} _{3, p} ₄
ХС ЛПОНП	0,63±0,1	0,87±0,17	1,1±0,05	0,98±0,17	<i>p</i> _{1, p} _{2, p} _{3, p} ₄
ХС ЛПНП, ммоль/л	3,6±0,42	4,8±0,80	5,0±0,42	4,9±0,95	<i>p</i> _{1, p} _{2, p} ₃
ХС ЛПВП, ммоль/л	1,24±0,14	0,89±0,15	1,1±0,18	0,99±0,13	<i>p</i> ₂
КА, ед.	3,41±0,58	6,37±0,92	5,45±0,8	5,94±1,2	<i>p</i> _{2, p} _{3, p} ₄

ТГ, ммоль/л	1,38±0,2	1,91±0,37	2,40±0,11	2,02 ±0,27	<i>p₁, p₂, p₃, p₄</i>
СЖК, ммоль/л	0,41±0,08	0,75±0,19	0,97±0,08	0,80±0,19	<i>p₂, p₃, p₄</i>

Среди обследованных женщин превышение концентрации ХС ЛПНП в крови по сравнению с референсным интервалом (2,0–4,0 ммоль/л) выявлено только у лиц с ожирением и СД 2 типа. Уровни ХС ЛПВП в крови пациенток всех групп и подгрупп находились в пределах референсного интервала (0,8–2,2 ммоль/л), но у больных ожирением были ниже по сравнению со значениями лиц контрольной группы. Расчет коэффициента атерогенности показал, что значение КА только у метаболически некомпromетированных женщин не превышало порогового значения (4,0 ед.), тогда как у женщин с ожирением показатели КА были достоверно выше. Средние значения КА, как в основной группе в целом, так и в ее подгруппах достоверно превышали таковой у лиц контрольной группы. Статистически значимое различие по данному показателю между женщинами подгрупп – с ИР и СД 2 типа – не выявлено.

Концентрация триглицеридов в крови соответствовала референсным значениям (0,45-1,6 ммоль/л) только у метаболически некомпromетированных женщин, у всех пациенток с ожирением данный показатель превышал верхнюю границу нормы. По сравнению со средним значением ТГ у лиц контрольной группы этот показатель у больных ожирением был достоверно выше, как в целом в группе, так и в подгруппах. Причем у больных СД 2 типа уровень ТГ в крови был статистически значимо выше, чем у лиц с ИР.

Уровни СЖК в крови у пациенток с ожирением достоверно превышали референсные значения (0,10-0,45 ммоль/л) и были в 2 раза выше, чем у

женщин группы сравнения, у которых находились в пределах нормы. Причем концентрация СЖК в крови у больных СД 2 типа была больше, чем у лиц с ИР, хотя и недостоверно.

Результаты оценки липидного обмена свидетельствуют, что по сравнению с группой метаболически некомпроментированных пациентов в подгруппах лиц с ожирением – с ИР и с СД 2 типа – все изученные показатели были достоверно повышены (кроме общего ОХС в подгруппе с ИР), за исключением ХС ЛПВП, которые были достоверно снижены. Статистически значимы были различия всех показателей липидного обмена между подгруппами метаболически компроментированных больных, кроме уровней ХС ЛПВП и КА.

3.4. Уровни адипокинов и С-реактивного белка

Средние концентрации лептина и адипонектина в крови метаболически некомпроментированных женщин находились в пределах референсного интервала (соответственно 3,7–17,0 нг/мл и 4,0-19,4 мкг/мл), тогда как у всех больных ожирением, так и в подгруппах уровень лептина был достоверно повышен, а адипонектина – снижен (таблица 6).

Показательны различия между группами метаболически компроментированных и некомпроментированных пациентов по содержанию в крови адипокинов. Так, по сравнению с контрольной группой уровни лептина были выше в 2,9 и 2,5 раза, а адипонектина – ниже в 2,4 и 5,8 раз у пациентов с ИР и СД 2 типа соответственно (все $p < 0,05$).

Концентрации белка острой фазы ультрачувствительного СРБ (hsCRP) у пациенток всей группы метаболически компроментированных лиц и ее подгрупп превышали верхний уровень референсного интервала (5,0 мг/л), тогда как у женщин контрольной группы соответствовали ему. hsCRP в крови у пациентов подгрупп с ИР и с СД 2 типа не различались достоверно,

но по сравнению с контрольной группой были статистически значимо повышены в 4,7 и 3,8 раза соответственно.

Таблица 6 – Уровни адипокинов и С-реактивного (ультрачувствительного) белка у пациентов обследованных групп ($\bar{X} \pm SD$)

Показатели	Метаболически некомпромети- рованные, n=10	Метаболически компрометированные			<i>p</i>
		больные с ожирением и ИР, n=36	больные с ожирением и СД 2 типа, n=10	Всего, n=46	
Лептин, нг/мл	14,9±4,03	44,0±18,3	38,1±12,2	42,7±17,2	<i>p</i> ₂ , <i>p</i> ₃ , <i>p</i> ₄
Адипонектин, мкг/мл	12,9±1,33	5,1±2,81	2,2±0,60	4,5±2,77	<i>p</i> ₁ , <i>p</i> ₂ , <i>p</i> ₃ , <i>p</i> ₄
hsCRP, мг/л	3,8±0,65	18,1±1,46	14,5±0,52	16,3±2,13	<i>p</i> ₂ , <i>p</i> ₃ , <i>p</i> ₄

* * *

Согласно полученным результатам клинического и лабораторного обследований женщин, включенных в исследование, установлено, что лица контрольной и основной групп, а также подгруппы пациенток с ИР и с СД 2 типа, достоверно различаются между собой по наличию и выраженности ожирения и тяжести метаболических расстройств.

Глава 4
ЭКСПРЕССИЯ микроРНК, АССОЦИИРОВАННЫХ
С АДИПОГЕНЕЗОМ, У БОЛЬНЫХ АЛИМЕНТАРНО-
КОНСТИТУЦИОНАЛЬНЫМ ОЖИРЕНИЕМ
(Результаты собственных исследований)

Результаты первого этапа анализа полученных данных ПЦР – средние значения ΔCt изученных микроРНК в висцеральной жировой ткани, нормализованные с учетом эндогенного контроля RNU6B, приведены в таблице 7.

Таблица 7 – Значения ΔCt микроРНК в висцеральной жировой ткани ($\bar{X} \pm \text{SE}$)

Микро-РНК	Метаболически некомпromетированные, n=10	Метаболически компromетированные			<i>p</i>
		больные с ожирением и ИР, n=36	Больные с ожирением и СД 2 типа, n=10	Всего, n=46	
miR-29b	-1,69±0,11	-4,36±0,13	-5,07±0,16	-4,51±0,113	<i>p</i> ₁ , <i>p</i> ₂ , <i>p</i> ₃ , <i>p</i> ₄
miR-126	-2,59±0,11	-0,68±0,08	1,28±0,11	-0,25±0,137	<i>p</i> ₁ , <i>p</i> ₂ , <i>p</i> ₃ , <i>p</i> ₄
miR-132	0,75±0,08	-4,40±0,12	-2,56±0,20	-4,00±0,15	<i>p</i> ₁ , <i>p</i> ₂ , <i>p</i> ₃ , <i>p</i> ₄
miR-143	-5,69±0,09	-12,4±0,15	11,50±0,17	-12,2±0,13	<i>p</i> ₁ , <i>p</i> ₂ , <i>p</i> ₃ , <i>p</i> ₄
miR-155	0,96±0,085	-4,59±0,11	-5,90±0,12	-4,88±0,12	<i>p</i> ₁ , <i>p</i> ₂ , <i>p</i> ₃ , <i>p</i> ₄
miR-375	7,84±0,17	7,13±0,13	7,45±0,23	7,19±0,11	<i>p</i> ₂

Примечание (здесь и далее в главе 4) – *p*₁ – достоверность различий между пациентами с ИР и СД 2 типа, *p*₂ – достоверность различий между пациентами с ИР и контрольной группой, *p*₃ – достоверность различий между пациентами с СД 2 типа и контрольной группой, *p*₄ – достоверность различий между всеми метаболически компromетированными пациентами и контрольной группой, *p*<0,05

Различия значений ΔCt для miR-29b и miR-126 для всех пар сравнения были достоверны ($p < 0,05$). Такая же ситуация определена в отношении ΔCt и для miR-132, miR-143 и miR-155, кроме различия между всеми метаболически компрометированными пациентами ($n=46$) и больными ожирением с ИР ($n=36$), которое не было достоверным ($p > 0,05$). Для miR-375 показана достоверность различий только между лицами контрольной группы и пациентками с ожирением с ИР.

В таблице 8 показаны средние значения ΔCt изученных микроРНК в сыворотке крови, нормализованные с учетом эндогенного контроля RNU6B.

Таблица 8 – Значения ΔCt микроРНК в сыворотке крови ($\bar{X} \pm \text{SE}$)

Микро-РНК	Метаболически некомпрометированные, $n=10$	Метаболически компрометированные			p
		больные с ожирением и ИР, $n=36$	больные с ожирением и СД 2 типа, $n=10$	Всего, $n=46$	
miR-29b	$-2,27 \pm 0,13$	$-5,38 \pm 0,14$	$-5,81 \pm 0,20$	$-5,48 \pm 0,12$	p_2, p_3, p_4
miR-126	$2,81 \pm 0,13$	$-1,44 \pm 0,10$	$1,34 \pm 0,12$	$-0,83 \pm 0,19$	p_2, p_3, p_4
miR-132	$-6,59 \pm 0,12$	$-5,21 \pm 0,10$	$-4,99 \pm 0,21$	$-5,16 \pm 0,09$	p_2, p_3, p_4
miR-143	$-1,41 \pm 0,08$	$-7,01 \pm 0,07$	$-6,70 \pm 0,09$	$-6,95 \pm 0,06$	p_2, p_3, p_4
miR-155	$-3,54 \pm 0,13$	$-6,38 \pm 0,08$	$-8,90 \pm 0,13$	$-6,93 \pm 0,17$	p_1, p_2, p_3, p_4
miR-375	$-1,87 \pm 0,21$	$0,59 \pm 0,12$	$-4,73 \pm 0,34$	$-0,56 \pm 0,38$	p_1, p_2, p_3, p_4

В отношении всех исследуемых микроРНК выявлены достоверные различия средних значений ΔCt для всех пар сравнения, кроме miR-155 и miR-375, для

которых не показано статистически значимое различие между группами больных с ожирением с ИР и с СД 2 типа.

Результаты второго этапа вычислений экспрессии микроРНК в висцеральной жировой ткани – определение $\Delta\Delta Ct$ – уровня экспрессии исследуемой микроРНК каждого пациента относительно среднего значения одноименной микроРНК контрольной группы пациентов, представлены в таблице 9. Как и ожидалось, согласно формуле расчета показателя $\Delta\Delta Ct$ у лиц контрольной группы были равны нулю.

Таблица 9 – Значения $\Delta\Delta Ct$ микроРНК в висцеральной жировой ткани ($\bar{X} \pm SE$)

Микро-РНК	Метаболически некомпromетированные, n=10	Метаболически компрометированные			<i>p</i>
		Больные с ожирением и ИР, n=36	Больные с ожирением и СД 2 типа, n=10	Всего, n=46	
miR-29b	0,00±0,11	-2,67±0,13	-3,38±0,16	-2,83±0,11	<i>p</i> ₁ , <i>p</i> ₂ , <i>p</i> ₃ , <i>p</i> ₄
miR-126	0,00±0,11	1,92±0,08	3,870±0,11	2,34±0,14	<i>p</i> ₁ , <i>p</i> ₂ , <i>p</i> ₃ , <i>p</i> ₄
miR-132	0,00±0,08	-5,15±0,12	-3,31±0,20	-4,75±0,15	<i>p</i> ₁ , <i>p</i> ₂ , <i>p</i> ₃ , <i>p</i> ₄
miR-143	0,00±0,09	-6,75±0,15	-5,81±0,17	-6,55±0,13	<i>p</i> ₁ , <i>p</i> ₂ , <i>p</i> ₃ , <i>p</i> ₄
miR-155	0,00±0,08	-5,55±0,11	-6,86±0,12	-5,84±0,12	<i>p</i> ₁ , <i>p</i> ₂ , <i>p</i> ₃ , <i>p</i> ₄
miR-375	0,00±0,17	-0,30±0,13	-0,39±0,23	-0,64±0,11	<i>p</i> ₄

Различия средних значений $\Delta\Delta Ct$ всех микроРНК в висцеральной жировой ткани для всех пар сравнения были достоверны, за исключением miR-375. Для этой микроРНК статистически значимо $\Delta\Delta Ct$ отличалась

только у группы всех метаболически компрометированных лиц по сравнению с контрольной группой женщин.

Значения показателей $\Delta\Delta Ct$ микроРНК в сыворотке крови пациентов, приведены в таблице 10. Как видно из приведенных данных, результаты $\Delta\Delta Ct$ у лиц контрольной группы равны нулю, что согласуется с ожидаемыми результатами в соответствии с формулой расчета.

Таблица 10 – Значения $\Delta\Delta Ct$ микроРНК в сыворотке крови ($\bar{X} \pm SE$)

Микро-РНК	Метаболически некомпрометированные, n=10	Метаболически компрометированные			p
		Больные с ожирением и ИР, n=36	Больные с ожирением и СД 2 типа, n=10	Всего, n=46	
miR-29b	0,00±0,13	-3,11±0,14	3,54±0,20	-3,21±0,12	p_1, p_2, p_3, p_4
miR-126	0,00±0,13	1,37±0,09	4,15±0,12	1,98±0,19	p_1, p_2, p_3, p_4
miR-132	0,00±0,11	1,38±0,09	1,60±0,21	1,43±0,09	p_2, p_3, p_4
miR-143	0,00±0,08	-5,60±0,07	-5,29±0,09	-5,54±0,06	p_2, p_3, p_4
miR-155	0,00±0,13*	-2,84±0,08	-5,36±0,13	-3,39±0,17	p_1, p_2, p_3, p_4
miR-375	0,00±0,21	2,46±0,12	-2,86±0,34	1,31±0,35	p_1, p_2, p_3, p_4

Расчет $\Delta\Delta Ct$ для miR-132 и miR-143 показал, что достоверность различий средних значений показателя наблюдалась между группами пациентами с ИР и контрольной, с СД 2 типа и контрольной группой, а также между всеми метаболически компрометированными пациентами и контрольной группой, но не между подгруппами лиц с ожирением – с ИР и

СД 2 типа. Для остальных изученных микроРНК значения $\Delta\Delta Ct$ отличались статистически значимо во всех исследуемых парах сравнения.

Третим этапом было вычисление $2^{-\Delta\Delta Ct}$ – уровня экспрессии определенной микроРНК для каждого пациента. Согласно формуле расчета $2^{-\Delta\Delta Ct}$ уровень экспрессии микроРНК, как и ожидалось, у лиц контрольной группы был равен единице (таблица 11).

Таблица 11 – Значения уровней экспрессии микроРНК ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) в висцеральной жировой ткани ($\bar{X} \pm SE$)

Микро-РНК	Метаболически некомпromетированные, n=10	Метаболически компromетированные			<i>p</i>
		больные с ожирением и ИР, n=36	больные с ожирением и СД 2 типа, n=10	Всего, n=46	
miR-29b	1,03±0,069	7,3±0,66	10,9±1,06	8,08±0,60	<i>p</i> _{1, p} _{2, p} _{3, p} ₄
miR-126	1,03±0,08	0,28±0,01	0,07±0,01	0,23±0,017	<i>p</i> _{2, p} _{3, p} ₄
miR-132	1,01±0,06	39,9±3,29	10,8±1,54	33,5±3,15	<i>p</i> _{1, p} _{2, p} _{3, p} ₄
miR-143	1,02±0,06	124,5±10,4	59,4±6,43	110,4±9,16	<i>p</i> _{1, p} _{2, p} _{3, p} ₄
miR-155	1,01±0,06	51,2±3,46	119,5±9,20	66,1±5,34	<i>p</i> _{1, p} _{2, p} _{3, p} ₄
miR-375	1,06±0,13	1,94±0,24	1,46±0,22	1,83±0,19	<i>p</i> _{2, p} _{3, p} ₄

При этом, если среднее значение $2^{-\Delta\Delta Ct}$ микроРНК в исследуемой группе превышало 1, то уровень ее экспрессии был кратно выше, чем в контрольной группе. Тогда как, если среднее значение $2^{-\Delta\Delta Ct}$ микроРНК в исследуемой

группе было меньше 1, то уровень ее экспрессии был ниже, чем в контрольной группе.

Уровень экспрессии miR-29b в висцеральной жировой ткани в группе всех метаболически компрометированных пациентов (с ожирением) был в 8 раз выше, чем в контрольной группе, причем у женщин с ожирением и СД 2 типа на 33% превышал ($p < 0,05$) данный показатель у пациенток с ожирением и ИР.

Результаты проведенного исследования свидетельствуют, что уровни экспрессии miR-126 у всех метаболически компрометированных женщин в жировой ткани были достоверно ниже, чем в контрольной группе и не отличалась между группами с ИР и СД 2 типа.

Экспрессия miR-132 в висцеральной жировой ткани в 33,5 раза была выше в группе всех метаболически компрометированных пациенток по сравнению с метаболически некомпрометированными. Причем у женщин с ожирением и ИР ее уровень был в 4 раза выше, чем у пациенток с ожирением и СД 2 типа.

Проведенное исследование показало высокую кратность превышения экспрессии miR-143 у всех женщин с ожирением по сравнению с лицами контрольной группы – в 110 раз. В подгруппе пациенток с ИР ее уровень был в 2,1 раза выше, чем в подгруппе с СД 2 типа.

Уровень экспрессии miR-155 в жировой ткани у женщин с ожирением и ИР, напротив, был в 2,3 раза ниже по сравнению с подгруппой с ожирением и СД 2 типа. В целом уровень этой микроРНК у всех женщин с ожирением был в 66 раз выше, чем в контрольной группе.

Превышение уровня экспрессии miR-375 в висцеральной жировой ткани всех метаболически компрометированных пациенток по сравнению с метаболически некомпрометированными составило около 2 раз. При этом различий в экспрессии данной микроРНК в подгруппах с ИР и СД 2 типа выявлено не было.

Результаты определения экспрессии микроРНК в сыворотке крови представлены в таблице 12.

Таблица 12 – Значения уровней экспрессии микроРНК ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) в сыворотке крови ($\bar{X} \pm SE$)

МикроРНК	Метаболически некомпromетированные, n=10	Метаболически компromетированные			p
		Больные с ожирением и ИР, n=36	Больные с ожирением и СД 2 типа, n=10	Всего, n=46	
miR-29b	1,04±0,08	10,0±0,84	12,7±1,73	10,6±0,77	<i>p</i> _{2, p} _{3, p} ₄
miR-126	1,03±0,09	0,42±0,03	0,06±0,05	0,34±0,03	<i>p</i> _{2, p} _{3, p} ₄
miR-132	1,03±0,08	0,42±0,03	0,36±0,05	0,40±0,02	–
miR-143	1,01±0,06	50,5±2,36	39,9±2,52	48,2±2,02	<i>p</i> _{2, p} _{3, p} ₄
miR-155	1,04±0,09	7,6±0,40	42,5±3,57	15,1±2,29	<i>p</i> _{1, p} _{2, p} _{3, p} ₄
miR-375	1,09±0,14	0,20±0,02	9,13±1,92	2,14±0,68	<i>p</i> _{1, p} _{2, p} _{3, p} ₄

Содержание miR-29b в сыворотке крови примерно в 10 раза было выше в группе всех метаболически компromетированных пациенток по сравнению с метаболически некомпromетированными. У женщин с ожирением и ИР и у пациенток с ожирением и СД 2 типа ее уровни достоверно не различались.

Также, как и в висцеральной жировой ткани, в сыворотке крови уровень miR-126 у всех женщин с ожирением был ниже, чем у лиц

контрольной группы, и не было выявлено различий в содержании этой микроРНК у пациенток с ИР и СД 2 типа.

В отличие от висцеральной жировой ткани, в сыворотке крови уровень miR-132 у метаболически компрометированных женщин был ниже, чем у лиц контрольной группы, и статистически значимого различия между его уровнями у пациенток с ИР и СД 2 типа обнаружено не было.

В крови всех женщин с ожирением содержание miR-143 было в 48 раз выше, по сравнению с таковым у лиц контрольной группы. При этом у пациенток с ИР превышение уровня данной микроРНК составило только 21% ($p > 0,05$) по сравнению с уровнем у женщин с СД 2 типа.

Также как и в висцеральной жировой ткани, содержание miR-155 в сыворотке крови у всех женщин с ожирением было выше, чем в контрольной группе, в 15 раз. При этом у женщин с ожирением и СД 2 типа превышение данного параметра составило 42,5 раза, что в 5,6 раз больше, чем у пациенток подгруппы с ожирением и ИР.

В сыворотке крови всех метаболически компрометированных пациенток превышение уровня miR-375 составило около 2 раз по сравнению с метаболически некомпрометированными лицами, то есть также, как и в висцеральной жировой ткани. Однако было обнаружено статистическое значимое различие в подгруппах больных ожирением с ИР и СД 2 типа. Так, у первых содержание данной микроРНК было снижено в 5 раз, а у вторых – повышено в 9 раз по сравнению с лицами контрольной группы ($p < 0,05$).

* * *

Результаты проведенного исследования показали, 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.

Глава 5
ВЗАИМОСВЯЗЬ ЭКСПРЕССИИ АССОЦИИРОВАННЫХ С
АДИПОГЕНЕЗОМ микроРНК С АНТРОПОМЕТРИЧЕСКИМИ И
БИОХИМИЧЕСКИМИ ПОКАЗАТЕЛЯМИ БОЛЬНЫХ
АЛИМЕНТАРНО-КОНСТИТУЦИОНАЛЬНЫМ ОЖИРЕНИЕМ
(Результаты собственных исследований)

5.1. Корреляция уровней микроРНК с антропометрическими и
биохимическими показателями пациентов с алиментарно-
конституциональным ожирением

Результаты проведенного корреляционного анализа между уровнями экспрессии микроРНК и изученными у метаболически компрометированных пациентов показателями – антропометрических, углеводного и липидного обмена, адипокинов и высокочувствительного С-реактивного белка приведены в таблицах 13, 14, 15. В таблицы внесены все статистически значимые ($p < 0,05$) значения коэффициента корреляции по Спирмену – r_s .

В тексте данной главы обсуждаются выявленные в исследовании коэффициенты корреляции, значения которых превышают 0,5, то есть нижнюю границу интервала (0,5-0,7), соответствующего среднему уровню корреляционной связи (зависимости).

Проведенное исследование показало, что у больных ожирением и ИР уровень экспрессии miR-29b в висцеральной жировой ткани коррелировал с концентрациями адипонектина (отрицательно) и ХС ЛПВП, ХС ЛПОНП, ТГ, СЖК (положительно), а в сыворотке крови – с теми же показателями и концентрацией глюкозы. В подгруппе больных ожирением и СД 2 типа статистически значимых корреляций между исследуемыми параметрами ни в жировой ткани, ни в крови обнаружено не было.

Таблица 13 – Корреляция уровней экспрессии микроРНК и антропометрических и биохимических показателей у больных ожирением и инсулинорезистентностью, r_s (n=36)

Показатель и	miR 29b		miR 126		miR 143		miR 155		miR 375	
	ЖТ	Кр	ЖТ	Кр	ЖТ	Кр	ЖТ	Кр	ЖТ	Кр
ИМТ	—	0,4	-0,44	—	0,50	0,70	0,6	0,5	—	—
ОТ/ОБ	—	0,43	—	—	—	0,76	—	—	0,41	—
Глюкоза	—	0,54	—	—	—	—	—	—	—	—
ОГТТ	—	—	—	-0,4	—	—	—	—	—	—
НbA1c	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Инсулин	—	—	—	—	0,46	—	—	—	—	0,36
НОМА-IR	—	0,35	—	—	0,44	—	—	—	—	0,34
Саго-IR	—	—	—	—	0,40	—	—	—	—	—
Лептин	—	—	-0,91	—	—	0,43	0,79	0,62	—	—
Адипонектин	-0,55	-0,87	—	—	-0,48	-0,5	—	—	—	—
hsCRP	—	—	-0,25	—	—	0,94	0,92	0,88	—	—
ОХС	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ХС ЛПОНП	0,7	0,80	—	—	0,44	0,4	—	—	—	—
ХС ЛПНП	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ХС ЛПВП	0,65	0,76	—	—	0,41	0,37	—	—	—	—
ТГ	0,7	0,81	—	—	0,44	0,4	—	—	—	—
КА	—	—	—	—	—	—	-0,36	—	—	—
СЖК	0,59	0,91	—	—	0,46	0,47	—	—	—	—

Примечание (здесь в таблицах 14, 15 и 16) – указаны статистически значимые ($p < 0,05$) значения коэффициента корреляции по Спирмену – r_s . ЖТ – висцеральная жировая ткань, Кр – кровь, ИМТ – индекс массы тела, ОТ – окружность талии, ОБ – окружность бедер, ОГТТ – оральная глюкозотолерантная проба, НbA1c – гликированный гемоглобин, НОМА-IR – индекс

инсулинорезистентности, Саго-IR – индекс инсулинорезистентности, hsCRP – высокочувствительный С-реактивный белок, ОХС – общий холестерин, ХС ЛПВП – холестерин липопротеинов высокой плотности, ХС ЛПНП – холестерин липопротеинов низкой плотности, ХС ЛПОНП – холестерин липопротеинов очень низкой плотности, ТГ – триглицериды, КА – коэффициент атерогенности.

В целом в группе метаболически компрометированных пациентов корреляции средней силы для данной микроРНК были выявлены и в висцеральном жире, и крови с показателями липидного обмена – адипонектином, ХС ЛПВП, ХС ЛПОНП, ТГ и СЖК.

В подгруппе больных с ожирением и ИР содержание miR-126 коррелировало отрицательно только в жировой ткани с лептином – $r_s = -0,91$. У больных ожирением и СД 2 типа достоверной корреляционной связи между исследуемыми параметрами ни в жировой ткани, ни в крови обнаружено не было. Среди всех метаболически компрометированных больных уровень экспрессии miR-126 в жировой ткани отрицательно коррелировал с концентрацией глюкозы натощак ($r_s = -0,72$) и через 2 часа при выполненном оральном глюкозо-толерантном тесте ($r_s = -0,60$); с уровнем ОХС и ХС ЛПНП. В крови этих пациенток для miR-126 выявлена отрицательная корреляционная связь средней силы с вышеперечисленными параметрами углеводного и липидного обменов, а также с высокочувствительным С-реактивным белком ($r_s = -0,69$).

Статистически значимой корреляционной связи между уровнями miR-132 и всеми изученными показателями у больных не было выявлено ни в висцеральной жировой ткани, ни в сыворотке крови в подгруппах больных ожирением с ИР и с СД 2 типа. Для всех метаболически компрометированных больных для данной микроРНК показано наличие взаимосвязи только в висцеральной жировой ткани с hsCRP ($r_s = 0,78$) и ОХС.

Для уровней miR-143 в подгруппе больных с ожирением и ИР обнаружена положительная корреляционная связь средней силы в

висцеральном жире с ИМТ, а в крови – с ИМТ, ОТ/ОБ ($r_s = 0,76$), hsCRP ($r_s = 0,94$), и отрицательная – с адипонектином. Уровень этой микроРНК у

Таблица 14 – Корреляция уровней экспрессии микроРНК и антропометрических и биохимических показателей у больных ожирением и сахарным диабетом 2 типа, r_s (n=10)

Показатели	miR 143		miR 155		miR 375	
	ЖТ	Кр	ЖТ	Кр	ЖТ	Кр
ИМТ	—	—	0,69	—	0,78	—
ОТ/ОБ	—	—	—	—	—	—
Глюкоза	—	—	—	—	—	—
ОГТТ	—	—	—	—	—	—
HbA1c	—	—	—	—	—	—
Инсулин	—	—	—	—	—	—
НОМА-IR	—	—	—	—	—	—
Саго-IR	—	—	—	—	—	—
Лептин	—	0,64	0,92	0,79	0,75	—
Адипонектин	—	—	-0,76	-0,80	-0,74	—
hsCRP	—	—	0,78	0,76	—	—
ОХС	—	—	—	—	—	—
ХС ЛПОНП	—	—	0,79	0,73	0,83	—
ХС ЛПНП	—	—	—	—	—	—
ХС ЛПВП	—	—	—	—	—	—
ТГ	—	—	0,8	0,76	0,84	—
КА	—	—	—	—	—	—
СЖК	—	—	0,77	0,79	-0,83	—

больных ожирением и СД 2 типа коррелировал только в крови с лептином ($r_s = 0,64$). У всех метаболически компрометированных больных уровень miR-143 коррелировал в жировой ткани с hsCRP ($r_s = 0,70$), в крови – с ИМТ, ОТ/ОБ и hsCRP ($r_s = 0,84$). У больных ожирением и ИР выявлена статистически значимая корреляционная связь между уровнями miR-155 в висцеральной жировой ткани с ИМТ, лептином ($r_s = 0,79$), hsCRP ($r_s = 0,92$); в сыворотке крови – с ИМТ, лептином, hsCRP ($r_s = 0,88$). В подгруппе больных ожирением и СД 2 типа miR-155 в жировой ткани и крови коррелировала (сильная корреляция) с лептином ($r_s = 0,92$ и $r_s = 0,79$), адипонектином ($r_s = -0,76$ и $r_s = -0,80$), hsCRP ($r_s = 0,78$ и $r_s = 0,76$), ЛПОНП ($r_s = 0,79$ и $r_s = 0,73$), ТГ ($r_s = 0,80$ и $r_s = 0,76$), СЖК ($r_s = 0,77$ и $r_s = 0,79$) соответственно; с ИМТ – только в жировой ткани. В группе всех метаболически компрометированных больных уровень экспрессии miR-155 в жировой ткани коррелировал с концентрацией глюкозы натощак и через 2 часа при выполненном оральном глюкозо-толерантном тесте (ОГТТ), с уровнем ОХС ($r_s = 0,56$), ХС ЛПНП ($r_s = 0,50$), ХС ЛПОНП, ТГ и СЖК; в крови – с концентрацией глюкозы ($r_s = 0,82$) и ОГТТ ($r_s = 0,74$), с hsCRP ($r_s = 0,69$), с уровнем ОХС ($r_s = 0,76$), ХС ЛПНП ($r_s = 0,72$), ХС ЛПОНП, ТГ и СЖК.

Сильной и средней силы корреляционной связи между miR-375 и изученными антропометрическими и биохимическими показателями обнаружено не было среди больных ожирением и ИР ни в висцеральном жире, ни в крови. В подгруппе больных ожирением и СД 2 типа была выявлена сильная положительная корреляция уровня miR-375 только в висцеральной жировой ткани с ИМТ ($r_s = 0,78$), лептином ($r_s = 0,75$), ХС ЛПОНП ($r_s = 0,83$), ТГ ($r_s = 0,84$), отрицательная – с адипонектином ($r_s = -0,74$) и СЖК ($r_s = -0,83$). У всех метаболически компрометированных больных уровень экспрессии данной микро РНК в крови, но не жировой ткани коррелировал (связь средней силы) с концентрацией глюкозы натощак и при ОГТТ через 2 часа, HbA1c, hsCRP (отрицательно), ОХС, ХС ЛПНП.

Таблица 15 – Корреляция уровней экспрессии микроРНК и антропометрических и биохимических показателей у всех метаболически компрометированных пациентов, r_s (n=46)

Показатели	miR-29b		miR-126		miR-132		miR-143		miR-155		miR-375	
	ЖТ	Кр	ЖТ	Кр	ЖТ	Кр	ЖТ	Кр	ЖТ	Кр	ЖТ	Кр
ИМТ	—	0,24	—	—	—	—	0,48	0,67	—	—	—	—
ОТ/ОБ	—	0,37	-0,34	—	—	—	—	0,57	—	—	0,35	—
Глюкоза	0,4	0,47	-0,72	-0,67	-0,49	—	0,38	—	-0,67	-0,82	—	0,69
ОГТТ	—	—	-0,60	-0,52	-0,35	—	0,38	—	-0,61	-0,74	—	0,54
HbA1c	—	—	-0,40	—	—	—	—	—	-0,36	-0,41	—	0,52
Инсулин	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	-0,32	—
НОМА-IR	0,41	—	-0,32	—	—	—	—	—	—	0,33	0,32	—
Саго-IR	—	—	—	—	—	—	0,36	—	—	—	—	0,45
Лептин	—	—	-0,44	—	—	—	—	0,47	0,37	—	—	—
Адипонектин	-0,57	-0,75	0,48	0,31	—	—	—	—	0,46	0,45	—	-0,39
hsCRP	—	—	-0,29	0,69	—	—	0,7	0,84	—	0,69	—	-0,59
ОХС	0,43	0,3	-0,56	-0,55	—	—	0,31	0,29	0,56	0,76	—	0,62
ХС ЛПОНП	0,70	0,69	-0,45	-0,43	—	—	—	—	0,52	0,53	—	0,47
ХС ЛПНП	—	—	-0,5	-0,5	-0,46	—	-0,32	-0,37	0,5	0,72	—	0,58
ХС ЛПВП	0,66	0,56	-0,4	-0,41	-0,35	—	—	—	0,42	0,44	—	0,42
ТГ	0,70	0,69	-0,45	—	-0,44	—	—	—	0,52	0,53	—	-0,46
КА	—	—	-0,3	-0,43	-0,31	—	-0,35	-0,37	0,33	0,52	—	0,38
СЖК	0,67	0,75	-0,47	-0,43	-0,49	—	—	—	0,53	0,52	—	-0,42

5.2. Корреляция уровней одноименных микроРНК в висцеральной жировой ткани и сыворотке крови пациентов с алиментарно-конституциональным ожирением

Представляло интерес, наличие взаимосвязи между уровнями одноименных микроРНК в висцеральной жировой ткани и сыворотке крови. Результаты проведенных расчетов приведены в таблице 16.

Таблица 16 – Корреляция уровней одноименных микроРНК в висцеральной жировой ткани и сыворотке крови, r_s

МикроРНК	Больные с ожирением и инсулинорезистентностью (n=36)	Больные с ожирением и сахарным диабетом 2 типа (n=10)	Всего метаболически компрометированные пациенты (n=46)
miR-29b	0,57	—	0,55
miR-126	—	—	0,46
miR-132	—	—	—
miR-143	0,48	—	0,52
miR-155	0,84	0,89	0,90
miR-375	—	—	—

Наличие статистически значимой корреляции одноименных микроРНК в висцеральной жировой ткани и сыворотке крови средней силы (r_s 0,5-0,7), а особенно, высокой степени корреляции (r_s 0,7-0,9) позволяет рассматривать соответствующие микроРНК, как потенциальные лабораторные маркеры. Среди изученных микроРНК такое заключение можно сделать в отношении miR-29b, miR-143 и особенно miR-155.

* * *

Выполненный корреляционный анализ выявил у метаболически компрометированных пациентов наличие статистически значимых связей между уровнями экспрессии микроРНК в висцеральной жировой ткани, сыворотке крови и изученными показателями – антропометрическими, углеводного и липидного обмена, адипокинами и высокочувствительным С-реактивным белком.

Для miR-29b, miR-126, miR-143 показано наличие корреляции средней силы 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 ИР и с СД 2 типа.

Глава 6

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

(Обсуждение результатов исследования)

В данной главе сделана попытка сформулировать роль ассоциированных с адипогенезом микроРНК в патогенезе инсулинорезистентности при алиментарно-конституциональном ожирении и обосновать их возможное практическое применение в медицине. Для этого обобщены данные о различиях между больными с ожирением и лицами без ожирения в кратности изменений экспрессии микроРНК в крови в сравнении с таковой в жировой ткани, в степени корреляции уровней микроРНК с антропометрическими и биохимическими показателями, также учтены мишени изученных микроРНК и внутриклеточные сигнальные пути, задействованные в результате изменения экспрессии микроРНК.

У больных с инсулинорезистентностью (ИР), а также в группе больных СД 2 типа, по сравнению с метаболически некомпromетированными пациентами уровни miR-29b статистически достоверно повышены, примерно десятикратно, как в висцеральной жировой ткани, так и в сыворотке крови (таблица 17), что согласуется с данными Kong L. и соавт. и Wang X. и соавт. [221, 74]. Установлено, что уровень miR-29b умеренно ассоциирован с нарушениями как липидного, так и углеводного обмена у метаболически компromетированных больных (глава 5).

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'-

Таблица 17 – Уровни экспрессии микроРНК ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) у метаболически компрометированных пациентов по сравнению с контрольной группой (М [Q₁; Q₃])

МикроРНК	Больные с ожирением и инсулирорезистентностью (n=36)		Больные с ожирением и сахарным диабетом 2 типа (n=10)		Всего метаболически компрометированные пациенты (n=46)	
	Жировая ткань	Сыворотка крови	Жировая ткань	Сыворотка крови	Жировая ткань	Сыворотка крови
miR-29b	7,3 [4,02;9,58]	10,0 [5,31;14,2]	10,9 [8,94;13,1]	12,7 [8,06;15,0]	8,1 [4,31;12,4]	10,6 [5,88;14,2]
miR-126	0,28 [0,23;0,36]	0,42 [0,27;0,54]	0,07 [0,06;0,08]	0,06 [0,05;0,07]	0,23 [0,14;0,33]	0,34 [0,21;0,53]
miR-132	39,9 [26,0;50,1]	0,42 [0,33;0,51]	10,8 [6,97;14,3]	0,36 [0,22;0,50]	33,6 [18,1;46,0]	0,40 [0,27;0,53]
miR-143	124,5 [83,9;172,8]	50,5 [39,1;59,3]	59,5 [39,9;73,9]	40,0 [37,2;42,0]	110,4 [68,97;135,6]	48,2 [39,1;55,3]
miR-155	51,2 [34,5; 66,6]	7,55 [6,21;9,12]	119,5 [102,8;138,2]	42,5 [34,6;47,2]	66,1 [41,1;82,0]	11,8 [6,43;15,1]
miR-375	1,9 [1,03;1,95]	0,20 [0,13;0,24]	1,5 [1,12;1,84]	9,1 [3,92;11,4]	1,84 [1,05;1,92]	2,14 [0,15;0,46]

Примечание: М – медиана, Q₁ – первый квартиль, Q₃ – третий квартиль.

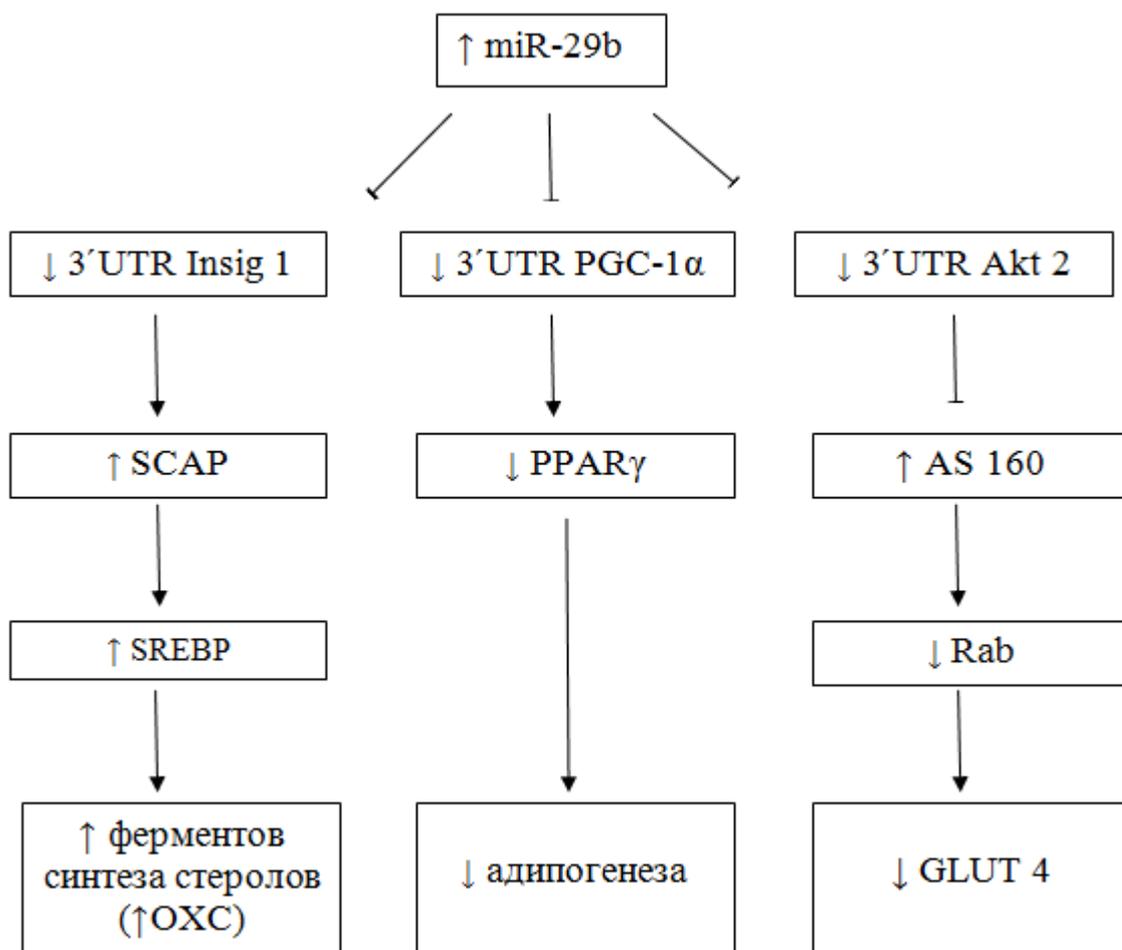


Рисунок 2 – Мишени miR-29b и вовлеченные внутриклеточные сигнальные пути.

Примечание: 3'UTR – untranslated region, Insig 1– Insulin induced gene 1, PGC-1α – Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator 1, Akt 2 – RAC-beta serine/threonine-protein kinase, SREBP – sterol regulatory element binding protein, SCAP – SREBP cleavage-activating protein, PPARγ – Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma, AS 160 – Akt substrate of 160 kDa, Rab – G-protein, GLUT 4 – Glucose transporter type 4.

untranslated region, некодирующий участок) мРНК Insig 1, мРНК PGC-1α и мРНК Akt 2 (рисунок 2). 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 (таблицы 5 и 15), 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 (таблица 15) 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 (таблица 18), которые наглядно изображены на рисунки 3 и 4, 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 (таблица 16) у метаболически компрометированных, позволяют сделать заключение о перспективности изучения данной микроРНК, как лабораторного маркера инсулинорезистентности.

Таблица 18 – Направленность и кратность различий уровней микроРНК

	miR-29b		miR-126		miR-132		miR-143		miR-155		miR-375	
	ЖТ	Кр										
ИР	↑	↑↑	↓	↓	↑↑	↓	↑↑↑	↑↑	↑↑	↑	↑	↓
СД 2 типа	↑↑	↑↑	↓↓	↓↓	↑↑	↓	↑↑	↑↑	↑↑↑	↑↑	↑	↑
ИР и СД2 типа	↑	↑↑	↓	↓	↑↑	↓	↑↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑	↑

Примечание: ЖТ – висцеральная жировая ткань, Кр. – сыворотка крови; ↑ – повышенный уровень, ↓ – пониженный уровень, по сравнению с контрольной группой; количество стрелок – кратность повышения/понижения (1 стрелка – на порядок, 2 стрелки – на два порядка, 3 стрелки – на три порядка).

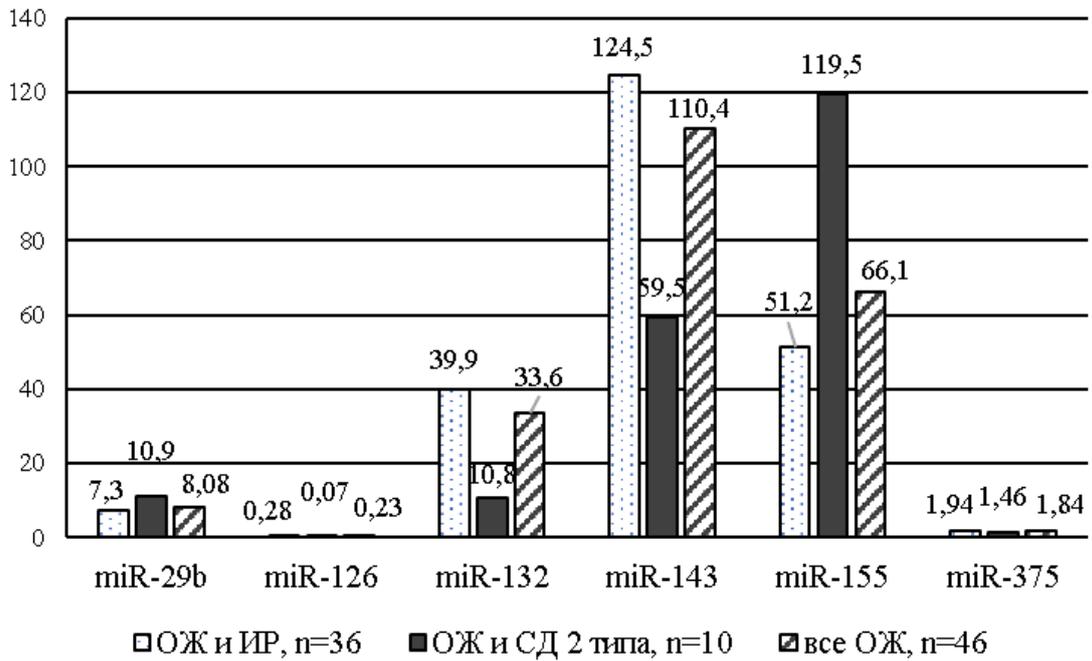


Рисунок 3 – Уровни экспрессии микроРНК у метаболически компрометированных пациентов в висцеральном жире.

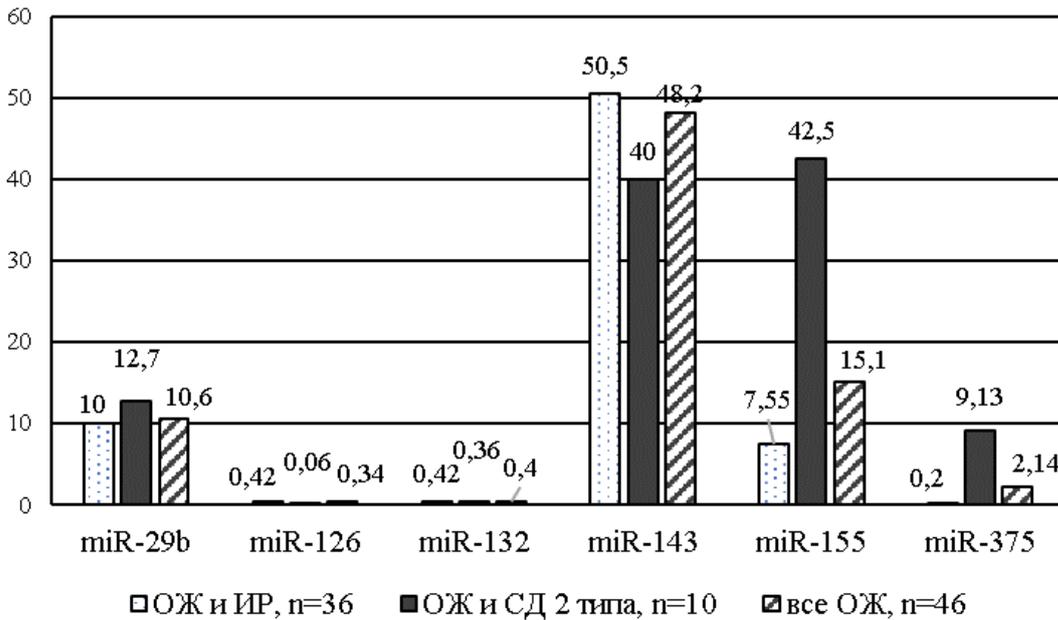


Рисунок 4 – Уровни экспрессии микроРНК у метаболически компрометированных пациентов в сыворотке крови.

У больных ожирением уровни **miR-126**, как в висцеральном жире, так и в сыворотке крови, ниже, чем у метаболически некомпromетированных лиц, при этом в подгруппе больных СД 2 типа ниже на порядок по сравнению с пациентками подгруппы с ИР (таблица 17), что согласуется с данными Regazzi R. и соавт. и Zampetaki A. и соавт [209, 264].

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 5).

Снижение уровня miR-126 у больных с ожирением приводит к уменьшению ее ингибирующего действия на воспалительный внутриклеточный каскад, что при переключении на сигнальный путь AMPK (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 $r_s=-0,43$) ($p<0,05$) (таблица 15) 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.

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 (таблица 15), 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 $r_s=-0,52$).

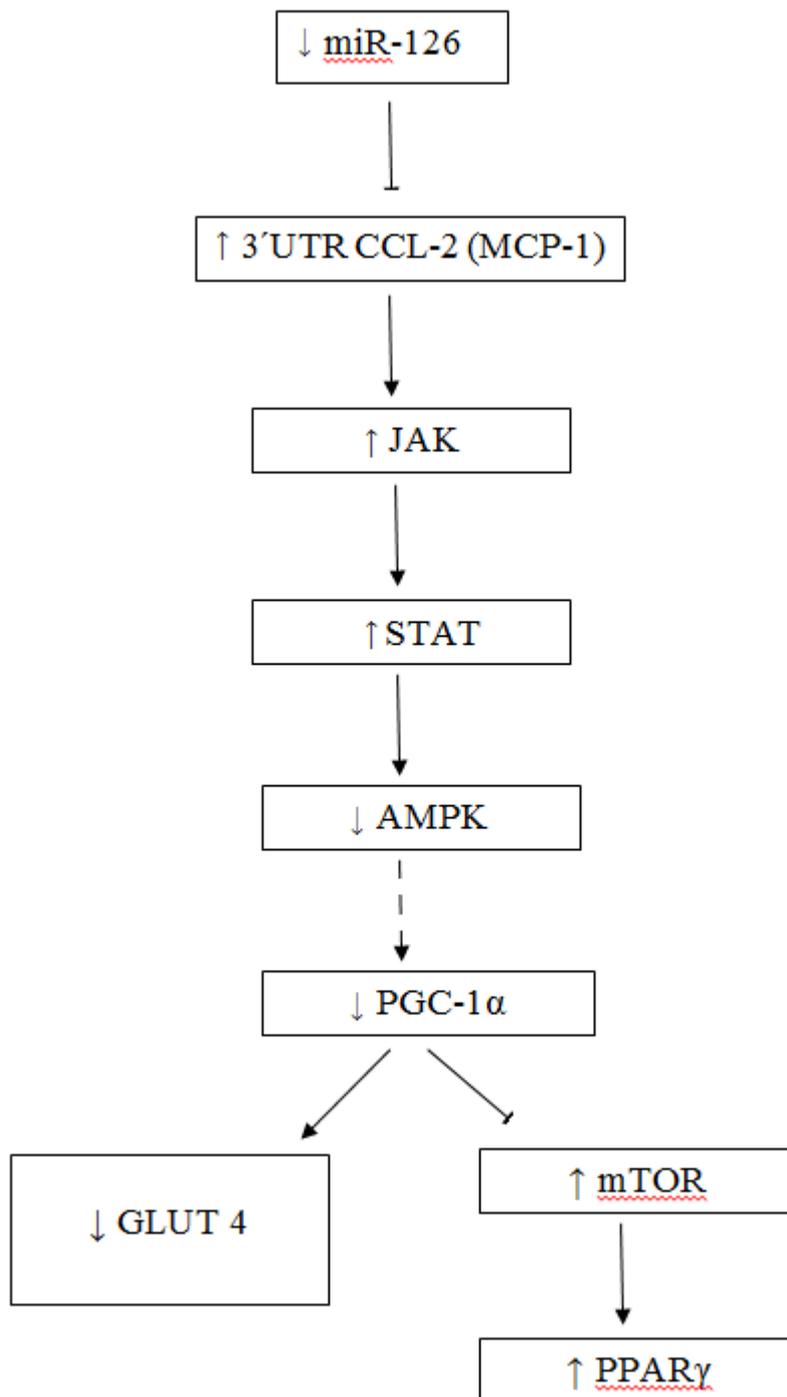


Рисунок 5 – Мишени miR-126 и вовлеченные внутриклеточные сигнальные пути.

Примечание: 3'UTR – untranslated region, CCL2 – C-C motif ligand 2, MCP-1 – Monocyte Chemoattractant Protein 1, JAK – Janus kinase, STAT – Signal transducer and activator of transcription, AMPK – AMP activated protein kinase, PGC-1 α – Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator 1, PPAR γ – Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma, mTOR – mammalian target of rapamycin, GLUT 4 – Glucose transporter type 4.

Полученные в исследовании данные согласуются с результатами анализа схем внутриклеточных сигнальных путей и позволяют считать miR-126 проинсулинорезистентной.

Несмотря на однонаправленность и соразмерное изменение уровня miR-126 в сыворотке крови и висцеральной жировой ткани у метаболически компрометированных пациентов (таблица 18), сделать заключение о перспективности изучения данной микроРНК, как лабораторного маркера инсулинорезистентности не представляется возможным, поскольку выявлена низкая степень взаимосвязи между уровнями данной микроРНК в вышеуказанных биологических материалах (таблица 16). Для рекомендации продолжения изучения miR-126 с целью коррекции инсулинорезистентности также не получено оснований. Использование miR-126 в качестве терапевтической мишени исключает факт снижения ее уровня у метаболически компрометированных лиц, а как таргетированное лекарственное средство – ее проинсулинорезистентные свойства.

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 (таблица 17), что согласуется с данными Heneghan Н. М. и соавт. [76]. 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 (таблица 18, рисунок 3 и 4) и отсутствие достоверной корреляции данной микроРНК в этих биоматериалах (таблица 16) 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 6).

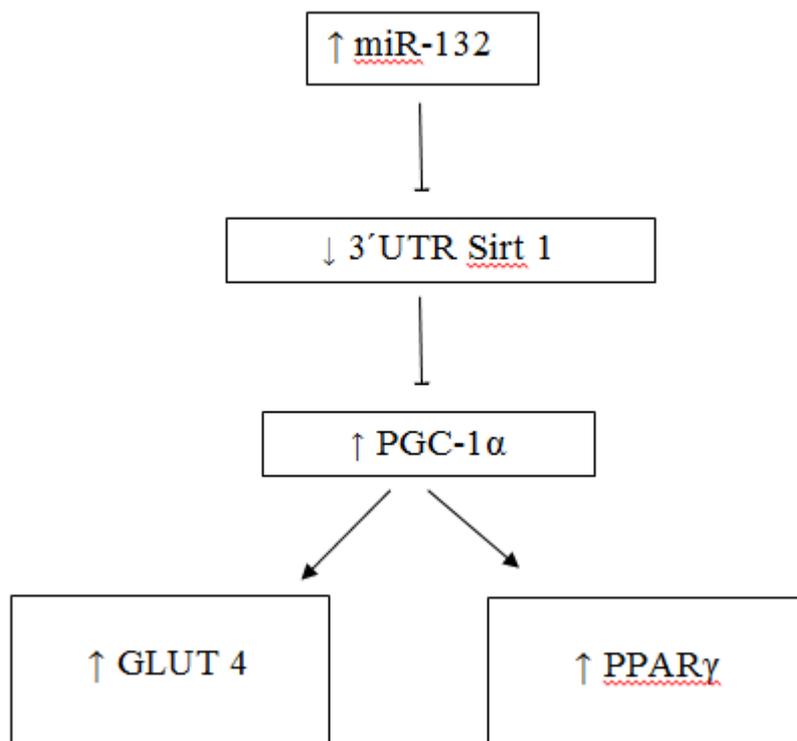


Рисунок 6 – Мишени miR-132 и вовлеченные внутриклеточные сигнальные пути.

Примечание: 3'UTR – untranslated region, Sirt1 – Silent Information Regulator 2 protein, PGC-1 α – Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator 1, PPAR γ – Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma, GLUT 4 – Glucose transporter type 4.

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-1 α , который активирует функционирование PPAR γ и GLUT-4. Повышенное содержание этих молекул стимулирует соответственно процессы адипогенеза и поглощения глюкозы

клетками мышечной и жировой тканей. Проведенный в исследовании корреляционный анализ выявил взаимосвязь уровня miR-132 и показателей липидного и углеводного обменов в висцеральной жировой ткани метаболически компрометированных пациентов (таблица 15). Так, 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.

У метаболически компрометированных пациенток экспрессия miR-143 в висцеральной жировой ткани значительно повышена – на три порядка во всей группе больных и подгруппе лиц с ожирением и ИР, на два порядка – в подгруппе лиц с ожирением и СД 2 типа (таблица 17). В крови уровень miR-143 также достоверно повышен по сравнению с метаболически некомпрометированными лицами у всех больных ожирением, так и в подгруппах с ИР и СД 2 типа, что согласуется с данными Cannataro R. и соавт., Hadeel A. Al-Rawaf. и Xihua L. и соавт. [118, 27, 63].

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, однонаправленность изменений ее уровней в жировой ткани и сыворотке крови (таблица 18, рисунки 3 и 4), а также наличие между этими изменениями корреляционной связи средней силы ($r_s=0,52$ ($p<0,05$)) (таблица 16), 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 (протеинкиназа B) (рисунок 7). У метаболически компрометированных

больных взаимодействие значительно увеличенного количества молекул miR-143 с мишенями приводит к выраженному уменьшению количества кодируемых этими мРНК белков.

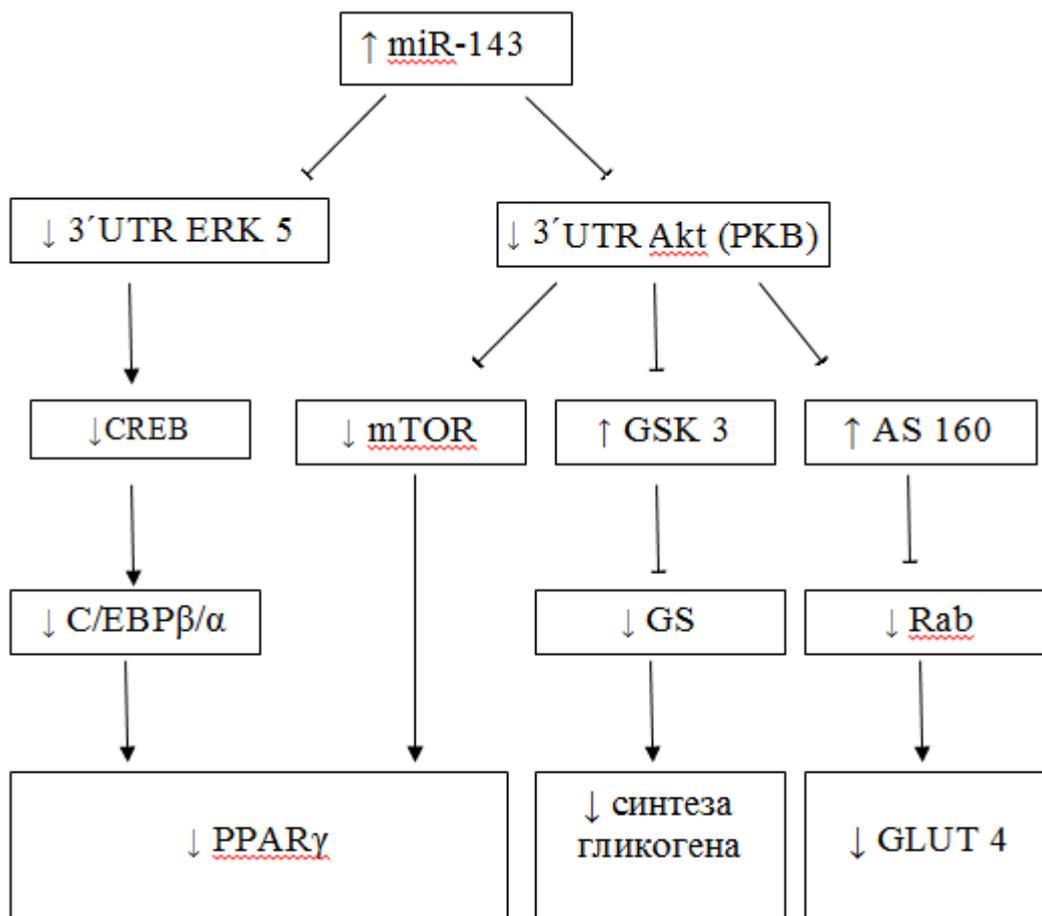


Рисунок 7 – Мишени miR-143 и вовлеченные внутриклеточные сигнальные пути.

Примечание: 3'UTR – untranslated region, ERK – Extracellular signal-regulated kinase, Akt – RAC-beta serine/threonine-protein kinase, CREB – cAMP response element-binding protein, mTOR – mammalian target of rapamycin, GSK – киназа гликогенсинтазы, PPAR γ – Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma, AS 160 – Akt substrate of 160 kDa, C/EBP β – CCAAT-enhancer-binding proteins, Rab – G-protein, GLUT 4 – Glucose transporter type 4.

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 $r_s=0,47$ ($p<0,05$) соответственно (таблица 13). 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 (рисунок 7), приводящий к уменьшению количества GLUT-4 в мембранах мышечных и жировых клеток.

Результаты проведенного в настоящем исследовании корреляционного анализа (таблицы 13, 14 и 15) 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 и адипонектином в сыворотке крови – $r_s=0,47$ и $r_s=-0,50$ ($p<0,05$). 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.

В висцеральной жировой ткани у метаболически компрометированных пациенток экспрессия miR-155 достоверно повышена – на два порядка во всей группе больных и подгруппе лиц с ожирением и ИР, а в подгруппе лиц с ожирением и СД 2 типа – на три порядка (таблица 17). В крови уровень miR-155 также достоверно повышен по сравнению с метаболически некомпрометированными лицами у всех больных ожирением, так и в подгруппах с ИР и СД 2 типа, выявлено статистически значимое ($p < 0,05$) различие между кратностью повышения значений уровней miR-155 в крови у пациенток с ИР (в 7,5 раз) и СД 2 типа (в 42,5 раз) по сравнению женщинами контрольной группы (рисунки 3 и 4).

Корреляционный анализ показал наличие связи высокой силы между уровнями miR-155 в висцеральной жировой ткани и сыворотке крови: r_s в группе всех больных ожирением равен 0,90, в подгруппах женщин с ИР – 0,84 и с СД 2 типа – 0,89 (таблица 16, рисунок 8).

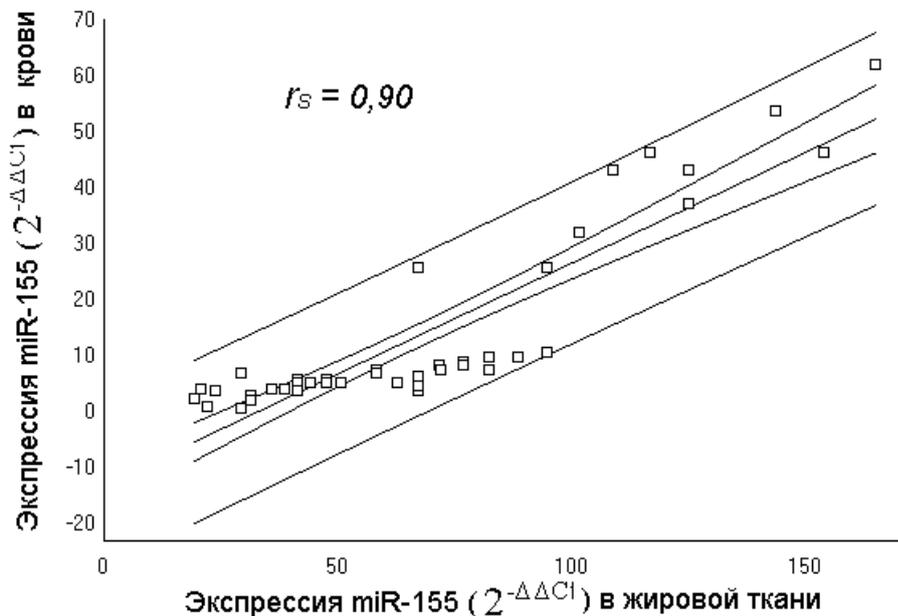


Рисунок 8 – График корреляционной зависимости между уровнями miR-155 в висцеральной жировой ткани и сыворотке крови у метаболически компрометированных больных.

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, однонаправленность изменений уровней данной микроРНК в обоих исследованных биоматериалах (таблица 18), а также наличие между этими изменениями корреляционной связи высокой силы (таблица 16, рисунок 8), 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 9). 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 (таблица 15) 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.

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.

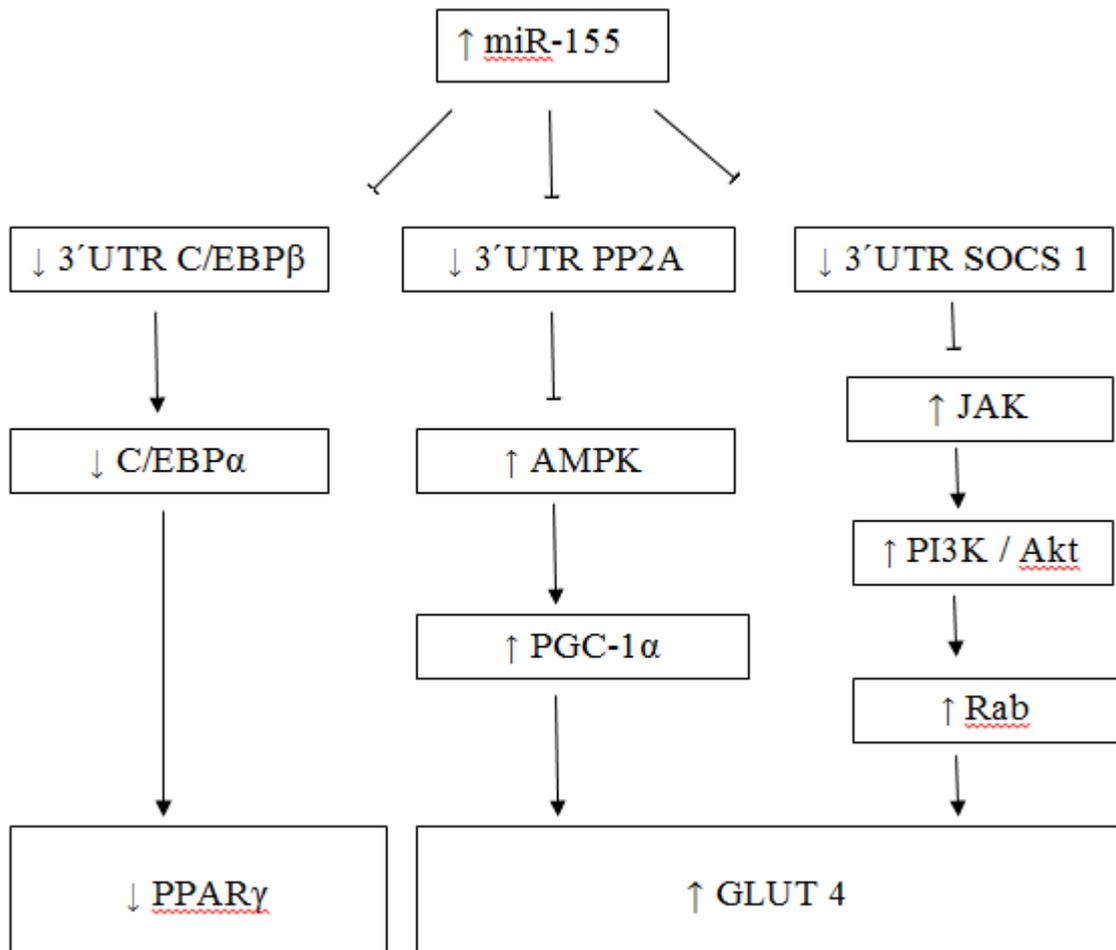


Рисунок 9 – Мишени miR-155 и вовлеченные внутриклеточные сигнальные пути.

Примечание: 3'UTR – untranslated region, C/EBPβ/α – CCAAT-enhancer-binding proteins, PP2A – Protein phosphatase 2, SOCS – Suppressor of cytokine signalling, Akt – RAC-beta serine/threonine-protein kinase, AMPK – AMP activated protein kinase, JAK – Janus kinase, PPARγ – Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma, Rab – G-protein, GLUT 4 – Glucose transporter type 4.

Это приводит к активному транспорту глюкозы в клетки и снижению уровня гликемии. В проведенном исследовании расчет корреляционных связей выявил наличие отрицательной связи между уровнем miR-155 в

висцеральном жире и крови с показателями углеводного обмена в сыворотке крови (таблица 15) – средней силы с концентрацией глюкозы натощак, через 2 часа при ОГТТ – $r_s=-0,67$ и $r_s=-0,82$, $r_s=-0,61$ и $r_s=-0,74$, слабой силы – с гликированным гемоглобином – $r_s=0,52$ соответственно (все $p<0,05$). Таким образом, полученные в исследовании результаты согласуются с данными анализа схем внутриклеточных сигнальных путей и позволяют считать miR-155 протективной, антиинсулинорезистентной микроРНК и целесообразным изучение ее применения для терапии ИР как таргетированное лекарственное средство.

Экспрессия miR-375 в висцеральной жировой ткани у метаболически компрометированных больных повышена незначительно, до двух раз (таблица 17). В сыворотке крови уровень miR-375 повышен у всех больных ожирением до двух раз, а также у лиц подгруппы с СД 2 типа – в 9 раз. При этом обращает на себя внимание, что уровень данной микроРНК в крови у пациенток подгруппы с ИР снижен в 5 раз по сравнению с метаболически некомпрометированными лицами, что хорошо заметно на диаграммах (рисунки 3 и 4) и могло бы быть использовано для дифференцировки ожирения с ИР и с СД 2 типа. Однако, несмотря на последнее обстоятельство, разнонаправленность изменений (таблица 18), а также низкая кратность как повышения, так и понижения уровня miR-375 у больных ожирением не позволяют рассматривать эту микроРНК, как лабораторный маркер инсулинорезистентности.

Мишенями miR-375 по информации международных баз данных являются 3'UTR мРНК ERK 1/2 и мРНК AdipoR (Adiponectin receptor) (рисунок 10). 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 (таблица 15),

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

Взаимодействие miR-375 с мРНК AdipoR, приводит к пониженной экспрессии последнего. Интересно, что 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 (таблица 14), а также достоверная обратная корреляционная связь слабой силы ($r_s = -0,39$ ($p < 0,05$)) между уровнями miR-375 и адипонектина в сыворотке крови (табл 15).

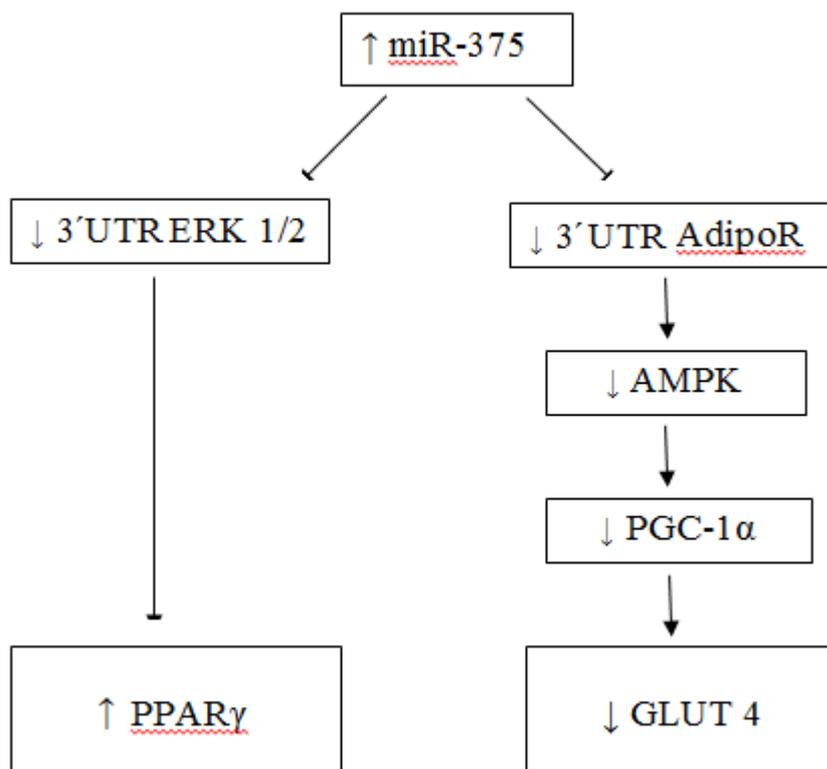


Рисунок 10 – Мишени miR-375 и вовлеченные внутриклеточные сигнальные пути.

Примечание: 3'UTR – untranslated region, ERK – extracellular signal-regulated kinase, AdipoR – Adiponectin receptor, AMPK – AMP activated protein kinase, PGC-1 α – Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator 1, PPAR γ – Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma, GLUT 4 – Glucose transporter type 4.

Понижение уровня AdipoR через внутриклеточный сигнальный путь АМРК 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 (таблица 15) – $r_s=0,69$, $r_s=0,54$ 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.

* * *

Таким образом, изученные микроРНК ассоциированы с адипогенезом: проадипогенные – miR-126, -132 и -375, антиадипогенные – miR-29b, -143 и -155, а также с инсулинорезистентностью: проинсулинорезистентные – miR-29b, -126, -143 и -375, антиинсулинорезистентные – miR-132 и -155.

МикроРНК, ассоциированные с адипогенезом и инсулинорезистентностью, перспективны для дальнейшего изучения (таблица 19) у больных с ожирением в качестве лабораторного маркера инсулинорезистентности – miR-29b, -143 и, особенно, miR -155, в качестве терапевтической мишени – miR-29b, и -143, как таргетированное лекарственное средство – miR-132 и -155.

Таблица 19 – Ассоциация экспрессии микроРНК с процессами адипогенеза и инсулинорезистентности и перспективы их практического применения

Микро РНК	Адипогенез	Инсулино-резистентность	Практическое применение
miR-29b	анти-адипогенная	проинсулино-резистентная	- лабораторный маркер - для терапии ИР как терапевтическая мишень
miR-126	про-адипогенная	проинсулино-резистентная	—
miR-132	про-адипогенная	антиинсулино-резистентная	- для терапии ИР как таргетированное лекарственное средство
miR-143	анти-адипогенная	проинсулино-резистентная	- лабораторный маркер - для терапии ИР как терапевтическая мишень
miR-155	анти-адипогенная	антиинсулино-резистентная	- лабораторный маркер - для терапии ИР как таргетированное лекарственное средство
miR-375	про-адипогенная	проинсулино-резистентная	—

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 некомпromетированными 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 СОКРАЩЕНИЙ

АФК – активные формы кислорода
ИМТ – индекс массы тела
ИР – инсулинорезистентность
ЛПВП – липопротеины высокой плотности
ЛПНП – липопротеины низкой плотности
ЛПОНП – липопротеины ичень низкой плотности
МКБ – международная классификация болезней
МС – метаболический синдром
МСК – мезенхимальные стволовые клетки
ОБ – объем бедер
ОЖ – ожирение
ОТ – объем талии
СД 2 типа – сахарный диабет 2 типа
ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания
ТГ – триглицериды
ОХС – общий холестерин
Adipor – Adiponectin receptor
ADSC – adipose derived stem cells
Ago2 – Argonaute protein
АКТ – protein kinase B
Akt 2 – RAC-beta serine/threonine-protein kinase
АМПК – cAMP activated protein kinase
AS 160 – Akt substrate 160 kDa
BAT – brown adipose tissue
Cav2 – caveolin protein
C/EBP β – CCAAT-enhancer-binding proteins
CCL2 – C-C motif ligand 2
CREB – cAMP response element-binding protein
DIO – diet induced obesity
eNOS – endodthelial NO syntase
ERK – extracellular signal regulated kinase
G6P – glucose-6-phosphatase
GLUT 4 – Glucose transporter type 4
GSK – glycogen syntase kinase
HbA1c – гликированный гемоглобин
HFD – high fat diet
IGF – insulin growth factor
IGFR – insulin growth fator receptor
IL – interleukin
Insig 1 – Insulin induced gene 1
IRS – insulin receptor substrate

JAK – Janus kinase
JNK – jun-NK-protein kinase
MAPK – mitogen activated protein kinase
MCP 1 – monocyte chemoattractant protein 1
mTOR – mammalian target of rapamycin
NF- κ B – nuclear factor kappa B
OHS – obesity hypoventilation syndrome
OPR – oxiterol binding protein
PGC-1 α – Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator 1
PI3K – phosphatidil inositol kinase 3
PIP3 - phosphatidil inositol 3
PKC - protein kinase B
PP2A – Protein phosphatase 2
PPAR γ – peroxisome proliferated activated receptor gamma
Rab – G-protein
RAS – rat sarcoma protein
RISC – RNA-induced silencing complex
SCAP – SREBP cleavage domain
SHR – spontaneously hypertensive rats
Sirt 1 – silent information regulator 1
SOCS – Suppressor of cytokine signalling
SREBP – sterol regulatory element binding protein
STAT – Signal transducer and activator of transcription
TNF α – tumor necrosis factor α
3'UTR – 3'untranslated region
VCAM – vascular cell adhesion molecule
VEGF – vascular endothelial growth factor
WAT – white adipose tissue

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бутрова, С.А. От эпидемии ожирения к эпидемии сахарного диабета / С. А. Бутрова // Международный эндокринологический журнал. – 2013. – №2(50). – С.19-24.
2. Возможности применения нового метаболического индекса при оценке инсулинорезистентности в клинической практике. / Г.Е Ройтберг [и др.] // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. — 2014.— Т. 10. — №3. — С. 264-274.
3. Галицкий, В. А. Гипотеза о механизме инициации малыми РНК метилирования ДНК de novo и аллельного исключения (рус.) / В. А. Галицкий // Цитология: журнал. — 2008. — Т. 50, № 4. — С. 277-286.
4. Дедов, И.И. Ожирение и нарушения липидного обмена: монография / И.И. Дедов. – М.: МИА, 2011. С. 53–57.
5. Дедов, И.И. Ожирение: этиология, патогенез, клинические аспекты / И.И. Дедов, Г. А. Мельниченко — Москва, Медицинское информационное агентство, 2004 г: 16–21.
6. Ивлеева, А.Ю. Избыточный вес и ожирение - проблема медицинская, а не косметическая / А. Ю. Ивлеева, С. Г. Бурков // Ожирение и метаболизм. – 2010. – Т.7. – №3. – С.15-19.
7. Карпищенко, А. И. Медицинские лабораторные технологии. Руководство по клинической лабораторной диагностике / А. И. Карпищенко – Гэотар-Медиа. – 2013. – Т. 2. - С. 91-96.
8. Клинические рекомендации по ожирению // Министерство здравоохранения РФ. – 2020. – 30 с.
9. Кравчук, Е.Н. Экспериментальные модели метаболического синдрома / Е. Н.Кравчук, М.М. Галагудза // Артериальная гипертензия. — 2014. — Т. 20, № 5. — С. 377–383.

10. Лабораторная диагностика нарушений обмена углеводов. Метаболический синдром, сахарный диабет. / В. В. Долгов [и др.] – М.–Тверь: ООО «Издательство «Триада», 2006. – 128 с.
11. Международная классификация болезней (МКБ-10); <http://мкб10.рф>
12. Метаболический синдром / Под.ред. чл.-корр. РАМН Г.Е. Ройтберга. – М.: МЕД-пресс-информ, 2007. – 224 с.
13. Ожирение в России: современный взгляд под углом социальных проблем / И. В. Лескова [и др.] // Ожирение и метаболизм - 2019 – Т. 6. - № 1. – С. 20–26.
14. Патогенез инсулинорезистентности при метаболическом ожирении / И.В. Лескова [и др.] // Биомедицинская химия. – 2015. - том 61. - вып. 1, с. 70–82.
15. Рекомендации экспертов Всероссийского научного общества кардиологов по диагностике и лечению метаболического синдрома // Министерство здравоохранения РФ. – 2013.
16. Щербо, С.Н. Персонализированная медицина: монография: в 7 т. / С.Н. Щербо, Д.С. Щербо. – Т. 1 : Биологические основы. – М.: РУДН, 2016. – 224 с.
17. A conformational switch in syntaxin during exocytosis: role of munc18 / I. Dulubova [et al.] // EMBO J.— 1999. — Vol. 18, № 16. — P. 4372-4382.
18. A signature of microRNA-155 in the pathogenesis of diabetic complications / A. M. Khamaneh [et al.] // Journal of physiology and biochemistry. — 2015. — Vol 71, № 2. — P. 301–309.
19. Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas / P. S. Eis [et al.] // Proc Natl Acad Sci U S A. — 2005. — Vol. 102. — P. 3627–3632.
20. Activation of MEK/ERK signaling promotes adipogenesis by enhancing peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) and C/EBP α gene expression during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes / D. Prusty [et al.] // J Biol Chem. — 2002. — Vol. 277. — P. 46226 – 46232.

21. Adaptive changes of the Insig1/SREBP1/SCD1 set point help adipose tissue to cope with increased storage demands of obesity / S. Carobbio [et al.] // *Diabetes*. —2013.— Vol.62. - №. 11. — P. 3697–3708.
22. Adipocyte differentiation of human bone marrow-derived stromal cells is modulated by microRNA-155, microRNA-221, and microRNA-222 / M. Skarn [et al.] // *Stem Cells Dev*. — 2012. — Vol. 21. — P. 873–883.
23. Adipocytic proportion of bone marrow is inversely related to bone formation in osteoporosis / S. Verma [et al.] // *J. Clin. Pathol*. — 2002. — Vol. 55. — P. 693–698.
24. Adipose tissue microRNAs as regulators of CCL2 production in human obesity / E. Arner [et al.] // *Diabetes*. — 2012. — Vol. 61, №8. — P.1986–1993.
25. Adipose tissue miRNA level variation through conjugated linoleic acid supplementation in diet-induced obese rats / M. Nazari [et al.] // *Adv Clin Exp Med*. — 2018. — Vol. 27, № 11. — P. 1477-1482.
26. Age-related changes in miR-143-3p:Igfbp5 interactions affect muscle regeneration / A. Soriano-Arroquia [et al.] // *Aging Cell*. — 2016. — Vol. 15, № 2. — P. 361–369
27. Al-Rawaf, H. A Circulating microRNAs and adipokines as markers of metabolic syndrome in adolescents with obesity / H. A. Al-Rawaf // *Clinical Nutrition*. — Vol. 38. — P. 2231-2238.
28. Alterations in microRNA expression contribute to fatty acid-induced pancreatic beta-cell dysfunction / P. Lovis [et al.] // *Diabetes*. — 2008. — Vol. 57. — P. 2728–2736.
29. Ambient glucose levels qualify the potency of insulin myogenic actions by regulating SIRT1 and FoxO3a in C₂C₁₂ myocytes / T. Nedachi [et al.] // *Am J Physiol Endocrinol Metab*. — 2008. — Vol. 294. — P. 668–678.
30. An integrative transcriptomic approach to identify depot differences in genes and microRNAs in adipose tissues from high fat fed mice / N. N. Wijayatunga [et al.] // *Oncotarget*. — 2018. — Vol. 9, № 10. P. 9246–9261.

31. Anderson, R. G. The caveolae membrane system. / R. G. Anderson // Annual review of biochemistry. — 1998. — Vol. 67. — P. 199—225.
32. Angiotensin II increases endoplasmic reticulum stress in adipose tissue and adipocytes / K. R. Menikdiwela [et al.] // Scientific Reports. — 2019. — Vol. 9. — e8481.
33. Antibody inhibition of synaptosomal protein of 25 kDa (SNAP-25) and syntaxin 1 reduces rapid exocytosis in insulin-secreting cells / J. Vikman [et al.] // J Mol Endocrinol. — 2006. — Vol. 36, № 3. — P. 503-515.
34. Arturo, S. B-MYB, a transcription factor implicated in regulating cell cycle, apoptosis, and cancer / S. Arturo // Eur J Cancer. — 2005. — Vol. 41. — P. 2479– 2484.
35. Association of MiR-126 with soluble mesothelin-related peptides, a marker for malignant mesothelioma / L. Santarelli [et al.] // PLoS One 6: - e18232, 2011
36. Attie, A. Insig: a significant integrator of nutrient and hormonal signals / A. Attie // J Clin Invest. — 2004.—Vol.113, № 8. — P. 1112–1114.
37. Autocrine role of Interleikin-13 on skeletal muscle glucose metabolism in type 2 diabetic patients involves microRNA let-7 / L.Q. Jiang [et al.] // Am J Phesiol Endocrinol Metab, 2013. – Vol.305. – P. E1359-E1366.
38. Bala, S. MicroRNA signature in alcoholic liver disease / S. Bala, G. Szabo // Int J Hepatol. — 2012. — e. 498232
39. Bartel, D. P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions / D. P. Bartel // Cell : journal. — Cell Press, 2009. — Vol. 136. - № 2. — P. 215— 233. — doi:10.1016/j.cell.2009.01.002.
40. B-cell receptor activation induces BIC/miR-155 expression through a conserved AP-1 element // Q. Yin [et al.] // J. Biol. Chem. — 2008. — Vol. 283. — P. 2654–2662.
41. Beltowski, J. Role of leptin in blood pressure regulation and arterial hypertension / J. Beltowski // J. Hypertens. 2008. Vol. 24, N 5. P. 789–801.

42. Bhaskaran, M. MicroRNAs: History, Biogenesis, and Their Evolving Role in Animal Development and Disease / M. Bhaskaran, M. Mohan // *Vet Pathol.* - 2014. - Vol. 51. - № 4. - P. 759–774.
43. Bhattacharya, I. Endothelin-1 inhibits adipogenesis: Role of phosphorylation of Akt and ERK1/2 / I. Bhattacharya, A. Ullrich // *FEBS Letters.* — 2006. — Vol. 580. — P. 5765–5771.
44. Bmk1/Erk5 is required for cell proliferation induced by epidermal growth factor / Y. Kato [et al.] // *Nature.* — 1998. — Vol. 395. — P. 713-716.
45. Boney, C. M. Modulation of insulin-like growth factor I mitogenic signaling in 3T3-L1 preadipocyte differentiation / C. M. Boney, R. M. Smith, P. A. Gruppuso // *Endocrinology.* — 1998. — Vol. 139. — P. 1638–1644.
46. Brown, M. S. A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood / M. S. Brown, J. L. Goldstein // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* — 1999. — Vol. 96 - № 20. — P. 11041–11048.
47. Burgermeister, E. MAPK kinases as nucleo-cytoplasmic shuttles for PPARgamma / E. Burgermeister, R. Seger // *Cell Cycle.* — 2007. — Vol. 6. — P. 1539–1548.
48. Burks, D. J. IRS proteins and beta-cell function / D. J. Burks, M. F. White // *Diabetes.* – 2001. – Vol. 50. - P. 140-145
49. C/EBPalpha is required for differentiation of white, but not brown, adipose tissue / H. G. Linhart [et al.] // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* — 2001. Vol. 98. — P. 12532–12537.
50. C/EBPbeta reprograms white 3T3-L1 preadipocytes to a Brown adipocyte pattern of gene expression / G. Karamanlidis [et al.] // *J. Biol. Chem.* — 2007. — Vol. 282. — P. 24660–24669.
51. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding / S. P. Weisberg [et al.] // *J. Clin. Investig.* — 2006. — Vol. 116. — P. 115-124.

52. Cellular munc18c levels can modulate glucose transport rate and GLUT4 translocation in 3T3L1 cells / S. L. Macaulay [et al.] // FEBS Lett. — 2002. — Vol. 528, № 1-3. — P. 154-160.
53. Changes in MicroRNA Expression Contribute to Pancreatic b-Cell Dysfunction in Prediabetic NOD Mice / E. Roggli [et al.] // Diabetes. — 2012. — Vol. 61, № 7. — P. 1742–1751.
54. Characterization of multiple signaling pathways of insulin in the regulation of vascular endothelial growth factor expression in vascular cells and angiogenesis / Z. Y. Jiang [et al.] // J Biol Chem. — 2003. — Vol. 278. — P. 31964–31971.
55. Chemerin as a mediator between obesity and vascular inflammation in children / K. Landgraf [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 2012. — Vol. 97, №. 4. — P. 556–564
56. Chronic lymphocytic leukemia modeled in mouse by targeted miR-29 expression / U. Santanam [et al.] // Proc Natl Acad Sci USA. — 2010. — Vol. 107. — P. 12210–12215.
57. Chronic rapamycin treatment causes glucose intolerance and hyperlipidemia by upregulating hepatic gluconeogenesis and impairing lipid deposition in adipose tissue / V. Houde [et al.] // Diabetes. — 2010. — Vol. 59. — № 6. — P. 1338-48.
58. Circulating Levels of MicroRNA from Children with Newly Diagnosed Type 1 Diabetes and Healthy Controls: Evidence That miR-25 Associates to Residual Beta-Cell Function and Glycaemic Control during Disease Progression / L. Nielsen [et al.] // Experimental Diabetes Research. — 2012. — Vol. 2012. — P. 7-19.
59. Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans / G. K. Wang [et al.] // European heart journal. — 2010. — Vol. 31, № 6. P 659–666.

60. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection / P. S. Mitchell [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 2008. — Vol. 105, № 30, P. 10513–10518.
61. Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease / S. Fichtlscherer [et al.] // *Circulation research*. — 2010. — Vol. 107, № 5. — P. 677–684.
62. Circulating miR-141-3p, miR-143-3p and miR-200c-3p are differentially expressed in colorectal cancer and advanced adenomas / H. J. Ardila [et al.] // *Mol Clin Oncol*. — 2019. — Vol. 11, № 2. — P. 201–207.
63. Circulating miR-143-3p inhibition protects against insulin resistance in Metabolic Syndrome via targeting of the insulin-like growth factor 2 receptor / L. Xihua [et al.] // *Transl Res*. — 2019. — Vol. 205. — P.33-43.
64. Circulating miR-146a, miR-34a and miR-375 in type 2 diabetes patients, pre-diabetic and normal-glycaemic individuals in relation to β -cell function, insulin resistance and metabolic parameters / R. E. García-Jacobo [et al.] // *Clin Exp Pharmacol Physiol*. — 2019. — Vol. 29. doi: 10.1111/1440-1681.13147.
65. Clinical significance of circulating miR-126 quantification in malignant mesothelioma patients / M. Tomasetti [et al.] // *Clin Biochem*. — 2012. — Vol. 45. — P. 575–581.
66. Comprehensive functional screening of miRNAs involved in fat cell insulin sensitivity among women / I. Dahlman [et al.] // *Am J Physiol Endocrinol Metab*. — 2017. — Vol. 312, № 6. — P. 482-494.
67. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA / A. E. Pasquinelli [et al.] // *Nature*. — 2000. — Vol. 408. — P. 86-89.
68. Conversion to sirolimus in kidney-pancreas and pancreas transplantation / P. Matias [et al.] // *Transplant Proc*. — 2008. — Vol. 40, №(10). — P.3601-3605.

69. Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER / T. Yang [et al.] // *Cell*. — 2002. — Vol. 110, №(4). — P. 489–500.
70. Decreased expression of circulating microRNA-126 in patients with type 2 diabetic nephropathy: A potential blood-based biomarker / G. Al-Kafaji [et al.] // *Exp Ther Med*. — 2016. — Vol. 12, № 2. — P. 815–822.
71. Decreased Expression of Circulating miR-20a-5p in South African Women with Gestational Diabetes Mellitus / C. Pheiffer [et al.] // *Mol. Diagn. Ther.* — 2018. — Vol. 22. — P. 345–352.
72. Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBPbeta and/or C/EBPdelta gene / T. Tanaka [et al.] // *EMBO J*. — 1997. — Vol. 16. — P. 7432–7443.
73. Deiuiliis, J. A. MicroRNAs as regulators of metabolic disease: pathophysiologic significance and emerging role as biomarkers and therapeutics / J. A. Deiuiliis // *Int J Obes (Lond)*. — 2016. — Vol. 40, № 1. — P. 88–101.
74. Determination of 14 circulating microRNAs in Swedes in Iraqis with or without diabetes mellitus type 2 / X. Wang [et al.] // *PLoS One*. — 2014. — Vol. 9, № 1. - e86792. - doi: 10.1371/journal.pone.0086792. eCollection 2014.
75. Diabetes mellitus increases the in vivo activity of cytochrome P450 2E1 in humans / Z. Wang [et al.] // *Br J Clin Pharmacol*. — 2003. — Vol. 55, № 1. — P. 77–85.
76. Differential miRNA expression in omental adipose tissue and in the circulation of obese patients identifies novel metabolic biomarkers / H. M. Heneghan [et al.] // *J Clin Endocrinol Metab*. — 2011. — Vol. 96 — № 5. — P. 846— 850.
77. Dose-Response of High-Intensity Training (HIT) on Atheroprotective miRNA-126 Levels / B. Schmitz [et al.] // *Front Physiol*. — 2017. — Vol. 8. — P. 349.
78. Dumortier, O. MicroRNAs and metabolism crosstalk in energy homeostasis / O. Dumortier, C. Hinault, E. Van Obberghen // *Cell metabolism*. — 2013. — Vol. 18, № 3. — P. 312–324.

79. Dysregulated miR-155 Expression in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Patients with Type 2 Diabetes / N. E. Corral-Fernandez [et al.] // *Exp Clin Endocr Diab.* — 2013. — Vol. 121, № 6. — P. 347–353.
80. Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis / E. Van Rooij [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA.* — 2008. — Vol. 105. — P.13027–13032.
81. Effect of glucolipotoxicity and rosiglitazone upon insulin secretion / C. Marshall [et al.] // *Biochem Biophys Res Commun.* — 2007. — Vol. 356, № 3. — P. 756-762.
82. Effects of sirolimus on plasma lipids, lipoprotein levels, and fatty acid metabolism in renal transplant patients / J. Morrisett [et al.] // *J Lipid Res.* — 2002. — Vol. 43, №(8). — P.1170-80.
83. Endothelial-specific intron-derived miR-126 is down-regulated in human breast cancer and targets both VEGFA and PIK3R2 / N. Zhu [et al.] // *Mol Cell Biochem.* — 2011. Vol. 351. — P. 157–164.
84. Epithelial microRNAs regulate gut mucosal immunity via epithelium – T-cell crosstalk / M. Biton [et al.] // *Nat. Immunol.* — 2011. — Vol. 12. — P. 239–246.
85. Essential role for miR-196a in brown adipogenesis of white fat progenitor cells / M. Mori [et al.] // *PLoS Biol.* — 2012. — Vol. 10. — e1001314.
86. Exercise training prevents the microvascular rarefaction in hypertension balancing angiogenic and apoptotic factors: role of microRNAs-16, -21, and -126 / T. Fernandes [et al.] // *Hypertension.* — 2012. — Vol. 59. — № 2. — P. 513–520.
87. Expression and activity of the cytochrome P450 2E1 in patients with nonalcoholic steatosis and steatohepatitis / H. Chtioui [et al.] // *Liver Int.* — 2007. — Vol. 27, № 6. — P. 764–771.

88. Extracellular matrix secretion by cardiac fibroblasts: role of microRNA-29b and microRNA-30c / M. Abonnenc [et al.] // *Circ Res.* — 2013. — Vol. 113. — P. 1138–1147.
89. Fasshauer, M. Adipokines in health and disease / M. Fasshauer, M. Bleher // *Trends Pharmacol. Sci.* — 2015. — Vol. 36. — № 7. — P. 461–470.
90. Fish, J. E. miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity / J. E. Fish, M. M. Santoro // *Dev. Cell.* — 2008. — Vol. 15 — P. 272–284.
91. Five serum microRNAs for detection and predicting of ovarian cancer / W. Wang [et al.] // *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol X.* — 2019. — Vol. 3. E100017.
92. Frost, R.J. Control of glucose homeostasis and insulin sensitivity by the Let-7 family of microRNAs / R.J. Frost, E.N. Olson // *Proc Natl Acad Sci USA.* — 2011. — Vol. 108. — № 52. — P. 21075-21080.
93. Gebeshuber, C. A. miR-29a suppresses tristetraprolin, which is a regulator of epithelial polarity and metastasis / C. A. Gebeshuber, K. Zatloukal, J. Martinez // *EMBO Rep.* — 2009. — Vol. 10. — P. 400–405.
94. Gene expression changes in rat white adipose tissue after a high-fat diet determined by differential display / I. P. Lopez [et al.] // *Biochem Biophys Res Commun.* — 2004. — Vol. 21, №318(1). — P.234-239.
95. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study / M. Ng [et al.] // *Lancet.* — 2014. — Vol. 384 (9945). — P. 766-781.
96. Glucose phosphorylation is required for insulin-dependent mTOR signalling in the heart / S. Sharma [et al.] // *Cardiovasc Res.* — 2007. — Vol.76, № 1. — P. 71-80.
97. Gyurus, E. Sirolimus therapy predisposes to new-onset diabetes mellitus after renal transplantation: a long-term analysis of various treatment regimens / E.

- Gyurus, Z. Kaposztas, B. Kahan // *Transplant Proc.* —2011. — Vol. 43. — №5. — P. 1583-1592.
98. Hardie, D. G. The AMP-activated protein kinase - fuel gauge of the mammalian cell? / D. G. Hardie, D. Carling // *Eur J Biochem.* — 1997. — Vol. 246. — P. 259–273.
99. Hepatocyte-specific deletion of SIRT1 alters fatty acid metabolism and results in hepatic steatosis and inflammation / A. Purushotham [et al.] // *Cell Metab.* — 2009. — Vol. 9. — P.327–338.
100. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man / D. R. Matthews [et al.] // *Diabetologia*, 1985, Vol. 28 № 7. P. 412-419. doi: <https://doi.org/10.1007/bf00280883>
101. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells / P. A. Zuk [et al.] // *Mol. Biol. Cell.* — 2002. — Vol. 13. — P. 4279–4295.
102. Human primary adipocytes exhibit immune cell function: adipocytes prime inflammation independent of macrophages / K. Meijer [et al.] // *PLoS ONE.* — 2011. — Vol.6. — e17154.
103. Identification of circulating miR-101, miR-375 and miR-802 as biomarkers for type 2 diabetes / C. Higuchi [et al.] // *Metabolism.* — 2015. — Vol. 64 — № 4. — P. 489-497.
104. Identification of complexes between the COOH-terminal domains of sterol regulatory element-binding proteins (SREBPS) and SREBP cleavage-activating protein / J. Sakai [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry.* — 1997.—Vol.272, №(32).—P.20213–20221.
105. Identification of particular groups of microRNAs that positively or negatively impact on beta cell function in obese models of type 2 diabetes / V. Nesca [et al.] // *Diabetologia.* — 2013. — Vol. 56, № 10. — P. 2203-2212.

106. Induced adiposity and adipocyte hypertrophy in mice lacking the AMP micro - activated protein kinase- α 2 subunit / J. A. Villena [et al.] // *Diabetes*. — 2004. — Vol. 53. — P. 2242–2249.
107. Inhibition of adipocyte differentiation by mechanical stretching through ERK-mediated downregulation of PPAR α / Y. Tanabe [et al.] // *J Cell Sci*. — 2004. — Vol. 117. — P. 3605–3614.
108. Initiation of myoblast to brown fat switch by a PRDM16-C/EBP- β transcriptional complex / S. Kajimura [et al.] // *Nature*. — 2009. — Vol. 460. — P. 1154–1158.
109. Insights into insulin-mediated regulation of CYP2E1: miR-132/-212 targeting of CYP2E1 and role of phosphatidylinositol 3-kinase, Akt (protein kinase B), mammalian target of rapamycin signaling in regulating miR-132/-212 and miR-122/-181a expression in primary cultured rat hepatocytes / U. Shukla [et al.] // *Drug Metab Dispos*. — 2013. — Vol. 41, № 10. — P.1769–1777.
110. Insulin producing cells generation by overexpression of miR-375 in adipose-derived mesenchymal stem cells from diabetic patients / M. Piran [et al.] // *Biologicals*. — 2017. — Vol. 46. — P. 23-28.
111. Insulin sensitive and resistant obesity in humans: AMPK activity, oxidative stress, and depot-specific changes in gene expression in adipose tissue / X. J. Xu [et al.] // *J Lipid Res*. — 2012. — Vol. 53. — P. 792–801.
112. Integrative mRNA-microRNA analyses reveal novel interactions related to insulin sensitivity in human adipose tissue / T. J. Kirby [et al.] // *Physiol Genomics*. — 2016. — Vol. 48. — №2. — P. 145–153.
113. Involvement of Dual Strands of miR-143 (miR-143-5p and miR-143-3p) and Their Target Oncogenes in the Molecular Pathogenesis of Lung Adenocarcinoma / H. Sanada [et al.] // *Int J Mol Sci*. — 2019. — Vol. 20, № 18. E4482. doi: 10.3390/ijms20184482.

114. Involvement of microRNAs in the cytotoxic effects exerted by proinflammatory cytokines on pancreatic beta-cells / E. Roggli [et al.] // *Diabetes*. — 2010. — Vol. 59. — P. 978–986.
115. Joaquin, M. Cell cycle regulation by the B-Myb transcription factor / M. Joaquin, R.J. Watson // *Cell Mol Life Sci*. — 2003. — Vol. 60. — P. 2389–2401.
116. Juge-Aubry, C.E. Adipose tissue: a regulator of inflammation / C.E. Juge-Aubry, E. Henrichot, C.A. Meier // *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab*. 2005. Vol. 19, N 4. P. 547–566.
117. KEGG: New perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs / M. Kanehisa [et al.] // *Nucleic Acids Res*. — 2017. — Vol. 45. — P. 353–361.
118. Ketogenic Diet Acts on Body Remodeling and MicroRNAs Expression Profile / Cannataro R. [et al.] // *MicroRNA*. — 2019. — Vol. 8. — P. 116-126.
119. Khvorova, A. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias (АНГЛ.) / A. Khvorova, A. Reynolds, S. D. Jayasena // *Cell*. — Cell Press, 2003. — Vol. 115, no. 2. — P. 209—216. — doi:10.1016/S0092-8674(03)00801-8. — PMID 14567918
120. Kim, S. Caveolin-2 regulation of the cell cycle in response to insulin in Hirc-B fibroblast cells / S. Kim, Y.Pak // *Biochem Biophys Res Commun*. — 2005. — Vol. 29. — № 330(1). — P. 88-96.
121. Kwon, H. S. The ups and downs of SIRT1 / H. S. Kwon, M. Ott // *Trends Biol Sci*. — 2008. — Vol. 609. — P. 1–9.
122. Lajoie, P. Regulation of raft-dependent endocytosis / P. Lajoie, I. R. Nabi // *Cell. Mol. Med*. — 2007. — Vol. 11, № 4. — P. 644—653.
123. Lang, T. Core proteins of the secretory machinery / T. Lang, R. Jahn // *Handb Exp Pharmacol*. — 2008. — Vol. 184. — P. 107—127.
124. Lee, R.C. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14* / R.C. Lee, R.L. Feinbaum, V. Ambros // *Cell*. — 1993. — Vol. 75, № 5. — P. 843–854.

125. Liu, S. TNF α -induced up-regulation of miR-155 inhibits adipogenesis by down-regulating early adipogenic transcription factors / S. Liu, Y. Yang, J. Wu // *Biochem Biophys Res Commun.* — 2011. — Vol. 414, № 3. — P. 618-624.
126. Livak, K. J. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real Time Quantitative PCR and the 2^{2DDC_T} Method. / K. J. Livak, T. D. Schmittgen // *Methods.* — 2001. — Vol. 25. — P. 402–408.
127. Liver-specific deletion of negative regulator Pten results in fatty liver and insulin hypersensitivity / B. Stiles [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA.* — 2004. — Vol. 101. — P.2082–2087.
128. Livingstone, C. Insulin-like growth factor-II: its role in metabolic and endocrine disease / C. Livingstone, A. Borai // *Clin Endocrinol (Oxf).* — 2014. — Vol. 80, № 6. — P. 773–781.
129. Long-term Administration of Rapamycin Reduces Adiposity, but Impairs Glucose To-lerance in High-Fat Diet-fed KK/HIJ Mice / G. Chang [et al.] // *Nordic Pharmacological Society. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology.* — 2009. — №108.— P. 188-198.
130. Mashima, R. Physiological roles of miR-155 / R. Mashima // *Immunology.* — 2015. — Vol. 145. — P. 323–333.
131. Measuring Insulin Resistance in Humans / V. R. Sharma [et al.] // *Horm Res Paediatr.* – 2021. – Vol. 4. – P. 1-12. doi: 10.1159/000515462
132. Metabolic adaptation in obesity and type II diabetes: myokines, adipokines and hepatokines / K. J. Oh [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* — 2016. — Vol. 18, № 1. E. 8. — doi:10.3390/ijms18010008.
133. Meydan, T. S. MicroRNA regulators of anxiety and metabolic disorders / T. S. Meydan, H. Soreq // *Trends Mol Med.* — 2016. — Vol. 22. — P. 798–812.
134. MicroRNA 132 regulates nutritional stress-induced chemokine production through repression of SirT1 / J. C. Strum [et al.] // *Mol Endocrinol.* — 2009. — Vol. 23, № 11. — P. 1876–1884.

135. microRNA -143 and -223 in obesity / I. D. Kilic [et al.] // *Gene*. — 2015. — Vol. 560, № 2. — P. 140-142.
136. MicroRNA 144 impairs insulin signaling by inhibiting the expression of insulin receptor substrate 1 in type 2 diabetes mellitus / D. S. Karolina [et al.] // *PloS one*. — 2011. — Vol. 6, № 8. — e 22839.
137. MicroRNA 29b functions in acute myeloid leukemia / R. Garzon [et al.] // *Blood*. — 2009. — Vol. 114. — P. 5331– 5341.
138. MicroRNA 29c is down-regulated in nasopharyngeal carcinomas, up-regulating mRNAs encoding extracellular matrix proteins / S. Sengupta [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA*. — 2008. — Vol. 105. — P. 5874– 5878.
139. MicroRNA biogenesis, functionality and cancer relevance / B. Kusenda [et al.] // *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub: journal*. — 2006. — Vol. 150. — №. 2. — P. 205—215. — doi:10.5507/bp.2006.029. — PMID 17426780.
140. MicroRNA expression in human omental and subcutaneous adipose tissue / N. Kloting [et al.] // *PLoS One*. — 2009. — Vol. 4. — № 3. — e. 4699.
141. MicroRNA expression is required for pancreatic islet cell genesis in the mouse / F. C. Lynn [et al.] // *Diabetes*. — 2007. — Vol. 56, №12. — P.2938-2945.
142. Micro-RNA profiling reveals a role for miR-29 in human and murine liver fibrosis / C. Roderburg [et al.] // *Hepatology*. 2011. — Vol. 53. — P. 209–218.
143. MicroRNA-126 inhibits cell viability and invasion in a diabetic retinopathy model via targeting IRS-1 / S. Fang [et al.] // *Oncol Lett*. — 2017. — Vol. 14. - № 4. — P. 4311–4318.
144. MicroRNA-126 overexpression rescues diabetes-induced impairment in efferocytosis of apoptotic cardiomyocytes / S. S. Babu [et al.] // *Sci Rep*. — 2016. — Vol.6. — e. 36207.

145. Micro-RNA-126 Reduces the Blood Thrombogenicity in Diabetes Mellitus via Targeting of Tissue Factor / M. Witkowski [et al.] // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* — 2016. — Vol. 36, № 6. — P. 1263–1271.
146. MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1 / T. A. Harris [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A.* — 2008. — Vol.105. — № 5. — P. 1516–1521.
147. MicroRNA-126 suppresses mesothelioma malignancy by targeting IRS1 and interfering with the mitochondrial function / M. Tomasetti [et al.] // *Antioxid Redox Signal.* — 2014.— Vol.21, № 15. — P. 2109–2125.
148. MicroRNA-132 modulates cholinergic signaling and inflammation in human inflammatory bowel disease / N. Maharshak [et al.] // *Inflamm Bowel Dis.* — 2013. — Vol. 19. — P. 1346–1353.
149. MicroRNA-132 potentiates cholinergic anti-inflammatory signaling by targeting acetylcholinesterase / I. Shaked [et al.] // *Immunity.* — 2009. — Vol. 31. — P.965–973.
150. MicroRNA-132-mediated loss of p120RasGAP activates the endothelium to facilitate pathological angiogenesis / S. Anand [et al.] // *Nat Med.* — 2010. — Vol. 16. — P. 909–914.
151. MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation / C. Esau [et al.] // *J Biol Chem.* — 2004. — Vol. 279. — P. 52361–52365.
152. MicroRNA-143 Regulates Adipogenesis by Modulating the MAP2K5–ERK5 Signaling / L. Chen [et al.] // *Scientific Reports.* — 2014. — Vol. 4.— e. 3819.
153. MicroRNA-143a-3p modulates preadipocyte proliferation and differentiation by targeting MAPK7 / P. Zhang [et al.] // *Biomedicine & Pharmacotherapy.* — 2018. — Vol. 108. — P. 531–539.
154. MicroRNA-155 regulates inflammatory cytokine production in tumour-associated macrophages via targeting C/EBPbeta / M. He [et al.] // *Cell Mol. Immunol.* — 2009. — Vol. 6. — P. 343–352.

155. MicroRNA-26a regulates insulin sensitivity and metabolism of glucose and lipids / X. Fu [et al.] // *J Clin Invest.* — 2015. — Vol.125. — № 6. — P. 2497–2509.
156. MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B / M. Fabbri [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA.* — 2007. — Vol. 104. — P. 15805– 15810.
157. MicroRNA-29 fine-tunes the expression of key FOXA2-activated lipid metabolism genes and is dysregulated in animal models of insulin resistance and diabetes / C. Kurtz [et al.] // *Diabetes.* — 2014. — Vol. 63, № 9. — P.3141-3148.
158. MicroRNA-29, a key regulator of collagen expression in systemic sclerosis / B. Maurer [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2010. — № 62. – P. 1733- 1743.
159. MicroRNA-29a is up-regulated in beta-cells by glucose and decreases glucose-stimulated insulin secretion / A. Bagge [et al.] // *Biochem Biophys Res Commun.*—2012.—Vol. 426, №2.—P.266-272.
160. MicroRNA-29a-c decrease fasting blood glucose levels by negatively regulating hepatic gluconeogenesis / J. Liang [et al.] // *J Hepatol.*—2013.—Vol.58, № 3.— P.535-542.
161. MicroRNA-375 inhibits osteogenic differentiation by targeting runt-related transcription factor 2 / F. Du [et al.] // *Exp. Ther. Med.* — 2015. — Vol. 10. — P. 207–212.
162. MicroRNA-375 promotes 3T3-L1 adipocyte differentiation through modulation of extracellular signal-regulated kinase signaling / H. Y. Ling [et al.] // *Clin Exp Pharmacol Physiol.* — 2011. — Vol. 38. — № 4. — P. 239–246.
163. MicroRNA-375 targets PDK1 in pancreatic carcinoma and suppresses cell growth through the Akt signaling pathway / J. Zhou [et al.] // *Int. J. Mol. Med.* — 2014. — Vol. 33. — P. 950–956.

164. MicroRNAs in platelet biogenesis and function: implications in vascular homeostasis and inflammation / A. Gatsiou [et al.] // *Current Vascular Pharmacology*. — 2012. — Vol. 10, №5. — P. 524–531.
165. MicroRNAs as Regulators of Insulin Signaling: Research Updates and Potential Therapeutic Perspectives in Type 2 Diabetes / L. Nigi [et al.] // *Int J Mol Sci*. — 2018. — Vol. 19, № 12. — e. 3705.
166. MicroRNAs in breastmilk and the lactating breast: potential immunoprotectors and developmental regulators for the infant and the mother / M. Alsaweed [et al.] // *Int J Environ Res Public Health*. — 2015. — Vol. 12. - №11. — P. 13981–14020.
167. miR-126 functions as a tumour suppressor in human gastric cancer / R. Feng [et al.] // *Cancer Lett*. — 2010. — Vol. 298. — P. 50–63.
168. MiR-126 Suppresses the Glucose-Stimulated Proliferation via IRS-2 in INS-1 β Cells / H. Tao [et al.] // *PLoS One*. — 2016. — Vol.11, №2. — e0149954.
169. miR-132 regulates antiviral innate immunity through suppression of the p300 transcriptional co-activator / D. Lagos [et al.] // *Nat Cell Biol*. — 2010. — Vol. 12. — P. 513–519.
170. miR-143 regulates proliferation and differentiation of bovine skeletal muscle satellite cells by targeting IGFBP5 / W. R. Zhang [et al.] // *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. — 2017. — Vol. 53, № 3. — P. 265–271.
171. MiR-143-3p directly targets GLUT9 to reduce uric acid reabsorption and inflammatory response of renal tubular epithelial cells / Z. Zhou [et al.] // *Biochem Biophys Res Commun*. — 2019. — Vol. 517, № 3. — P. 413-420.
172. MiR-143-3p suppresses the progression of nasal squamous cell carcinoma by targeting Bcl-2 and IGF1R / Y. Qian [et al.] // *Biochem Biophys Res Commun*. — 2019. — Vol. 518, № 3. — P. 492-499.

173. MiR-143-3p suppresses tumorigenesis in pancreatic ductal adenocarcinoma by targeting KRAS / F. Xie [et al.] // *Biomed Pharmacother.* — 2019. — Vol. 119. — e. 109424.
174. miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity / K.R. Cordes [et al.] // *Nature.* — 2009. — Vol. 460. — P. 705–710.
175. miR-155 Deletion in Female Mice Prevents Diet-Induced Obesity / D. G. Andrew [et al.] // *Scientific Reports.* — 2016. — Vol. 6. — e. 22862
176. MiR-155 Enhances Insulin Sensitivity by Coordinated Regulation of Multiple Genes in Mice / X. Lin [et al.] // *PLoS Genet.* — 2016. — Vol. 12, № 10. — e1006308.
177. miR-155 regulates differentiation of brown and beige adipocytes via a bistable circuit / Y. Chen [et al.] // *Nat Commun.* — 2013. — Vol. 4. — e. 1769.
178. miR-155: an ancient regulator of the immune system / E. Vigorito [et al.] // *Immunol Rev.* — 2013. — Vol. 253. — P. 146–157.
179. miR-212/132 expression and functions: within and beyond the neuronal compartment / A. Wanet [et al.] // *Nucleic Acids Res.* — 2012. — Vol. 40. — P. 4742–4753.
180. miR-29a levels are elevated in the db/db mice liver and its overexpression leads to attenuation of insulin action on PEPCK gene expression in HepG2 cells / A. Pandey [et al.] // *Mol Cell Endocrinol.* — 2010.—Vol.332.—P.125-133.
181. MiR-375 frequently downregulated in gastric cancer inhibits cell proliferation by targeting JAK2 / L. Ding [et al.] // *Cell Res.* — 2010. — Vol. 20. — P. 784–793.
182. miR-375 inhibits proliferation of mouse pancreatic progenitor cells by targeting YAP1 / Z.W. Zhang [et al.] // *Cell Physiol. Biochem.* — 2013. — Vol. 32. — P. 1808–1817.
183. Mir-375 maintains normal pancreatic alpha- and beta-cell mass / M. N. Poy [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A.* — 2009. — Vol. 106. — P. 5813–5818.

184. miR-375 negatively regulates porcine preadipocyte differentiation by targeting BMP2 / S. Liu [et al.] // *FEBS. Lett.* — 2016. — Vol. 590. — P. 1417–1427.
185. miR-375 targets 3'-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 and regulates glucose-induced biological responses in pancreatic beta-cells / A. Ouaamari [et al.] // *Diabetes.* — 2008. — Vol. 57. — P. 2708–2717.
186. Molecular Targets Related to Inflammation and Insulin Resistance and Potential Interventions / S. M. Hirabara [et al.] // *J. Biomed. Biotechnol.* — 2012. — e. 379024.
187. Monocyte chemotactic protein-1 is a potential player in the negative cross-talk between adipose tissue and skeletal muscle / H. Sell [et al.] // *Endocrinology.* — 2006. — Vol. 147. — P.2458–2467.
188. mTOR inhibition by rapamycin prevents beta-cell adaptation to hyperglycemia and exacerbates the metabolic state in type 2 diabetes / M. Fraenkel [et al.] // *Diabetes.* — 2008. — Vol. 57. — № 4. — P. 945-957.
189. Mudge, G. Sirolimus and Cardiac Transplantation: Is It the "Magic Bullet"? / G. Mudge // *Circulation.* — 2007. — Vol.116, № (23). — P.2666-2668.
190. NF-kappaB-YY1-miR-29 regulatory circuitry in skeletal myogenesis and rhabdomyosarcoma / H. J. Wang [et al.] // *Cancer Cell.* — 2008. — Vol. 14. —P. 369– 381.
191. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC1- α and SIRT / J. T. Rodgers [et al.] // *Nature.* — 2005. — Vol. 434. — P. 113–118.
192. Obesity and genetics regulate microRNAs in islets, liver, and adipose of diabetic mice / E. Zhao [et al.] // *Mamm Genome.* — 2009. — Vol. 20. — P. 476–485.
193. Obesity Downregulates MicroRNA-126 Inducing Capillary Rarefaction in Skeletal Muscle: Effects of Aerobic Exercise Training / J. L. Gomes [et al.] // *Oxid Med Cell Longev.* — 2017: e.2415246.

194. Obesity reduces the pro-angiogenic potential of adipose tissue stem cell-derived extracellular vesicles (EVs) by impairing miR-126 content: impact on clinical applications / G. Togliatto [et al.] // *Int J Obes (Lond)*. — 2016. — Vol.40, №1. —P. 102–111.
195. Obesity-induced overexpression of miRNA-143 inhibits insulin-stimulated AKT activation and impairs glucose metabolism / S. D. Jordan [et al.] // *Nat Cell Biol*. — 2011. — Vol. 13. — № 4. — P. 434—446.
196. OSBP-related protein 8 (ORP8) regulates plasma and liver tissue lipid levels and interacts with the nucleoporin Nup62 / T. Zhou [et al.] // *PLoS One*. — 2011. — Vol. 6, № 6. —e21078. — doi:10.1371/journal.pone.0021078
197. Overexpression of Insig-1 in the livers of transgenic mice inhibits SREBP processing and reduces insulin-stimulated lipogenesis / L. J. Engelking [et al.] // *J Clin Invest*. —2004.—Vol.113. — № 8. — P.1168–1175.
198. Overexpression of micro ribonucleic acid 29, highly up-regulated in diabetic rats, leads to insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes / A. He [et al.] // *Mol Endocrinol*. — 2007. — Vol.21 — №11. — P. 2785-2794.
199. Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance / N. Kamei [et al.] // *J Biol Chem*. — 2006. — Vol. 281. — № 36. — P. 26602-26614.
200. Pandit, K. V. MicroRNAs in idiopathic pulmonary fibrosis / K. V. Pandit, J. Milosevic, N. Kaminski // *Transl Res*. — 2011. — Vol. 157. — P.191– 199.
201. Peripheral blood circulating microRNA-4636/-143 for the prognosis of cervical cancer / S. Yin [et al.] // *J Cell Biochem*. — 2019. — doi: 10.1002/jcb.29305.
202. Plac8 Is an Inducer of C/EBPbeta required for brown fat differentiation, thermoregulation, and control of body weight / M. Jimenez-Preitner [et al.] // *Cell Metab*. — 2011. — Vol. 14. — P. 658–670.
203. Plasma MicroRNAs in Established Rheumatoid Arthritis Relate to Adiposity and Altered Plasma and Skeletal Muscle Cytokine and Metabolic Profiles / B. J.

- Andonian [et al.] // *Front. Immunol.* — 2019. — Vol. 10. — e.1475. doi: 10.3389/fimmu.2019.01475
204. Plasma miRNAs as early biomarkers for detecting hepatocellular carcinoma / Y. Wen [et al.] // *Int J Cancer.* — 2015. — Vol. 137. — P. 1679–1690.
205. Porubsky, P. R. Structures of human cytochrome P-450 2E1. Insights into the binding of inhibitors and both small molecular weight and fatty acid substrates / P. R. Porubsky, K. M. Meneely, E. E. Scott // *J Biol Chem.* — 2008. — Vol. 283, № 48. — P. 33698–33707.
206. PPAR γ -mediated G-protein coupled receptor 120 signaling pathway promotes transcriptional activation of miR-143 in adipocytes / I. S. Bae [et al.] // *Gene.* — 2017. — Vol. 624. — P. 64-69.
207. Pratt, A. J. The RNA-induced silencing complex: a versatile gene-silencing machine / A. J. Pratt, I. J. MacRae // *J. Biol. Chem. : journal.* — 2009. — Vol. 284, № 27. — P. 17897—17901. — doi:10.1074/jbc.R900012200. — PMID 19342379
208. Promotion Effects of miR-375 on the Osteogenic Differentiation of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell / S. Chen [et al.] // *Stem Cell Reports.* — 2017. — Vol. 8, № 3. — P. 773–786.
209. Regazzi, R. Diabetes Mellitus Reveals Its Micro-Signature / R. Regazzi // *Circulation Research.* — 2010. — Vol.107. P. 686–688.
210. Regulation of adipogenesis by a transcriptional repressor that modulates MAPK activation / S. W. Kim [et al.] // *J Biol Chem.* — 2001. — Vol. 276. — P. 10199–10206.
211. Regulation of microRNAs and their role in liver development, regeneration and disease / M. L. Finch [et al.] // *Int J Biochem Cell Biol.* — 2014. — doi:10.1016/j.biocel.2014.04.002. — PMID 24731940.
212. Regulation of resistin expression and circulating levels in obesity, diabetes, and fasting / M. W. Rajala [et al.] // *Diabetes.* 2014. — Vol. 53, N 7. — P. 1671–1679.

213. Renal medullary microRNAs in Dahl salt-sensitive rats: miR-29b regulates several collagens and related genes / Y. Liu [et al.] // *Hypertension*. — 2010. — Vol. 55. — P. 974–982.
214. Rna-binding protein hud controls insulin translation / E. K. Lee [et al.] // *Mol Cell*. — 2012. — Vol. 45. — P. 826–835.
215. Role of miR-155 in the regulation of lymphocyte immune function and disease / N. Seddiki [et al.] // *Immunology*. — 2014. — Vol. 142. — P. 32–38.
216. Role of nutrients and mTOR signaling in the regulation of pancreatic progenitors development / L. Elghazi [et al.] // *Mol Metab*. —2017.—Vol. 6. - №6 .— P. 560-573.
217. Rome, S. Are extracellular microRNAs involved in type 2 diabetes and related pathologies? / S. Rome // *Clinical biochemistry*. — 2013. — Vol. 46, № 10. — P. 937–945.
218. Rottiers, V. MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders / V. Rottiers, A. M. Naar // *Nat Rev Mol Cell Bio*. — 2012. — Vol. 13, № 5. — P. 239-250.
219. Sartipy, P. Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance / P. Sartipy, D. J. Loskutoff // *Proc Natl Acad Sci USA*. — 2003. — Vol. 100, № 12. — P. 7265–7270.
220. Seale, P. Transcriptional control of brown adipocyte development and physiological function--of mice and me / P. Seale, S. Kajimura, B. M. Spiegelman // *Genes Dev*. — 2009. — Vol. 23. — P. 788–797.
221. Significance of serum microRNAs in pre-diabetes and newly diagnosed type 2 diabetes: a clinical study / L. Kong [et al.] // *Acta Diabetologica*. — 2011. — Vol.48. — № 1. — P. 61-69.
222. Silencing of microRNA-155 in mice during acute inflammatory response leads to derepression of c/ebp Beta and down-regulation of G-CSF / J. Worm [et al.] // *Nucleic Acids Res*. — 2009. — Vol. 37. — P. 5784–5792.

223. Sirolimus is associated with new-onset diabetes in kidney transplant recipients / O. Johnston [et al.] // *J Am Soc Nephrol*. 2008.— Vol.19. — №7 — P.1411-1418.
224. SIRT1 exerts anti-inflammatory effect and improves insulin sensitivity in adipocytes / T. Yoshizaki [et al.] // *Mol Cell Biol*. — 2009. — Vol. 29. — P. 1363–1374.
225. Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR γ / F. Picard [et al.] // *Nature*. — 2004. — Vol. 429. — P. 771–776.
226. Slusarz, A. The two faces of miR-29 / A. Slusarz, L. Pulakat // *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*. —2015. —Vol.16, № 7. — P. 480-490.
227. Soreq, H. Checks and balances on cholinergic signaling in brain and body function / H. Soreq // *Trends Neurosci*. — 2015. — Vol. 38. — P. 448–458.
228. SPRED1, a RAS MAPK pathway inhibitor that causes Legius syndrome, is a tumour suppressor downregulated in paediatric acute myeloblastic leukaemia / E. Pasmant [et al.] // *Oncogene*. — 2015. — Vol.34, №5. — P. 631–638.
229. Sun, C. IRF-1 and miRNA126 modulate VCAM-1 expression in response to a high-fat meal / C. Sun, K. Alkhoury, Y. I. Wang // *Circ Res*. — 2012. —Vol.111, №8. — P.1054–1064.
230. Suppression of hepatic stellate cell activation by microRNA-29b / Y. Sekiya [et al.] // *Biochem Biophys Res Commun*. — 2011. — Vol. 412. — P. 74– 79.
231. Swimming training in rats increases cardiac MicroRNA-126 expression and angiogenesis / N. D. Da Silva [et al.] // *Medicine and Science in Sports and Exercise*. — 2012. — Vol. 44. — № 8. — P.1453–1462.
232. Takada, I. Wnt and PPAR γ signaling in osteoblastogenesis and adipogenesis / I. Takada, A. P. Kouzmenko, S. Kato // *Nat. Rev. Rheumatol*. — 2009. — Vol. 5. — P. 442–447.
233. TGF- β /Smad3 signaling promotes renal fibrosis by inhibiting miR-29 / W. Qin [et al.] // *J Am Soc Nephrol*. — 2011. — Vol. 22. — P.1462– 1474.

234. The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis / S. Wang [et al.] // *Dev. Cell.* — 2008. — Vol. 15. — P.261–271.
235. The gene-gene interaction of INSIG-SCAP-SREBP pathway on the risk of obesity in Chinese children / F. H. Liu [et al.] // *Biomed Res Int.* — 2014. — 538564. doi:10.1155/2014/538564
236. The HOMA-Adiponectin (HOMA-AD) Closely Mirrors the HOMA-IR Index in the Screening of Insulin Resistance in the Brazilian Metabolic Syndrome Study (BRAMS) / B. S. Vilela [et al.]// *PLoS One.* — 2016. — Vol. 11. — №8. — e0158751. — doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158751>
237. The induction of microRNA targeting IRS-1 is involved in the development of insulin resistance under conditions of mitochondrial dysfunction in hepatocytes / H. S. Ryu [et al.] // *PloS one.* — 2001. — Vol. 6, №3. — e17343.
238. The Lin28/let-7 axis regulates glucose metabolism / H. Zhu [et al.] // *Cell*, 2011. – Vol.147, № 1. – P. 81-94.
239. The metabolic syndrome alters the miRNA signature of porcine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells / Y. Meng [et al.] // *Cytometry A.* — 2018. — Vol. 93, № 1. — P. 93–103.
240. The microRNA miR-29 controls innate and adaptive immune responses to intracellular bacterial infection by targeting interferon- γ / F. Ma [et al.] // *Nat Immunol.* — 2011. — Vol. 12. — P. 861– 869.
241. The MicroRNA-132 and MicroRNA-212 Cluster Regulates Hematopoietic Stem Cell Maintenance and Survival with Age by Buffering FOXO3 Expression / A. Mehta [et al.] // *Immunity.* — 2015. — Vol. 42. — P. 1021–1032.
242. The microRNA-29 Family Dictates the Balance Between Homeostatic and Pathological Glucose Handling in Diabetes and Obesity / Dooley J. [et al.] // *Diabetes.* — 2016. — Vol. 65. — № 1, — P. 53-61.

243. The microRNA-29/PGC1 α regulatory axis is critical for metabolic control of cardiac function / X. Caravia [et al.] // PLoS Biol. – 2018. – Vol. 16. - № 10. -e.2006247. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2006247>
244. The miR-29 family: genomics, cell biology, and relevance to renal and cardiovascular injury / A. J. Kriegel [et al.] // Physiol Genomics. – 2012. – Vol. 44, № 4. – P. 237-244.
245. The molecular scaffold kinase suppressor of Ras 1 (KSR1) regulates adipogenesis / R. L. Kortum [et al.] // Mol. Cell Biol. — 2005. — Vol. 25. — P. 7592–7604.
246. The role of circulating microRNA-126 (miR-126): a novel biomarker for screening prediabetes and newly diagnosed type 2 diabetes mellitus / Y. Liu [et al.] // Int J Mol Sci. — 2014. — Vol.15, № 6. — P. 10567–10577.
247. The role of MAPKs in adipocyte differentiation and obesity / Bost, F. [et al.] // Biochimie. — 2005. — Vol. 87. — P. 51–56.
248. Thiaville, M. M. Oncogenic potential of yin yang 1 mediated through control of imprinted genes / M. M. Thiaville, J. Kim // Crit Rev Oncog. — 2011. — Vol. 16, №3-4. — P.199–209.
249. Thirone, A. C. Tissue-specific roles of IRS proteins in insulin signaling and glucose transport / A. C. Thirone, C. Huang, A. Klip // Trends Endocrinol. Metab. – 2006. – Vol. 17. P. 72-78.
250. Thong, F. S. L. Turning signals on and off: GLUT4 traffic in the insulin-signaling highway / F. S. L. Thong, C. B. Dugani, A. Klip // Physiology. – 2005. – Vol. 4. P. 271-284.
251. TNF-alpha antagonism with etanercept decreases glucose and increases the proportion of high molecular weight adiponectin in obese subjects with features of the metabolic syndrome / T. L. Stanley [et al.] // J Clin Endocrinol Metab. — 2011. — Vol. 96. — № 1. — e. 146–150
252. Transcriptional control of brown fat determination by PRDM16 / P. Seale [et al.] // Cell Metab. — 2007. — Vol. 6. P. 38–54.

253. Transcriptional regulation of adipogenesis / E. D. Rosen [et al.] // *Genes Dev.* — 2000. — Vol. 14. — P.1293–1307.
254. TRB3 blocks adipocyte differentiation through the inhibition of C/EBPbeta transcriptional activity / O. Bezy [et al.] // *Mol. Cell Biol.* — 2007. — Vol. 27. — P. 6818–6831.
255. Tsuchiya, A. PI3 kinase directly phosphorylates Akt1/2 at Ser473/474 in the insulin signal transduction pathway / A. Tsuchiya, T. Kanno, T. Nishizaki // *J Endocrinol.* — 2013. — Vol. 220. — P. 49–59.
256. Up-regulated expression of microRNA-143 in association with obesity in adipose tissue of mice fed high-fat diet / R. Takanabe [et al.] // *Biochem Biophys Res Commun.* — 2008. — Vol. 376. — P. 728–732.
257. Van Rooij, E. Developing microRNA therapeutics / E. Van Rooij, A. L. Purcell, A. A. Levin // *Circ Res.* — 2012. — Vol. 110. — P. 496–507.
258. Victoria, B. MicroRNAs and the Metabolic Hallmarks of Aging / B. Victoria, Y.O.N. Lopez, M.M. Masternak // *Mol Cell Endocrinol.* — 2017. — Vol. 455. — P. 131–147.
259. World Health Organisation "Waist Circumference and Waist-Hip Ratio, Report of a WHO Expert Consultation": <http://www.who.int/nutrition/publications/obesity/>
260. World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic. 1997, Geneva: WHO <http://www.euro.who.int/ru/health-topics/noncommunicable-diseases/obesity/obesity>
261. Xie, H. MicroRNAs induced during adipogenesis that accelerate fat cell development are downregulated in obesity / H. Xie, B. Lim, H. F. Lodish // *Diabetes.* — 2009. — Vol. 58. — P. 1050–1057.
262. Yan, D. Characteristics of oxysterol binding proteins / D. Yan, V.M. Olkkonen // *Int Rev Cytol.* — 2008. — Vol. 265. — P.253–285.
263. Yan, J.W. The emerging role of miR-375 in cancer / J. W. Yan, J.S. Lin, X.X. He // *Int. J. Cancer.* — 2014. — Vol. 135. — P. 1011–1018.

264. Zampetaki, A. Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial miR-126 and other microRNAs in type 2 diabetes / A. Zampetaki, S. Kiechl // *Circ. Res.* — 2010. — Vol. 107. — P.810–817.
265. Zhang, K. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response / K. Zhang, R. J. Kaufman // *Nature.* — 2008. — Vol. 454, № 7203. — P. 455–462.
266. Zhu, H. Identification of microRNA biomarkers in type 2 diabetes: a meta-analysis of controlled profiling studies / H. Zhu, S. W. Leung // *Diabetologia.* — 2015. — Vol. 58. — P. 900–911.