УДК 616.379-008.64:612.015.32

РОЛЬ МИКРОРНК В РАЗВИТИИ ИНСУЛИНОРЕЗИСТЕНТНОСТИ И ЕЁ ПОСЛЕДСТВИЙ У ЖЕНЩИН С ОЖИРЕНИЕМ

Тофило М.А., Егорова Е.Н., Лясникова М.Б., Белякова Н.А., Цветкова И.Г., Милая Н.О.
ФГБОУ ВО Тверской государственный медицинский университет Минздрава России

Value of microRNA in development of insuline resistance and it's concequences in females with obesity

Tofillo M.A., Egorova E.N., Lyasnikova M.B., Belyakova N. A., Tsvetkova I.G., Milaya N.O.
Tver State Medical University

Резюме.

Проанализированы данные антропометрического и лабораторного обследования 46 женщин с ожирением и инсулинорезистентностью (ИР), из них 10 – с сахарным диабетом 2-го типа, а также 10 женщин – группа контроля (без ожирения и ИР). Установлено статистически значимое снижение экспрессии miR-126 и достоверно повышенная экспрессия miR-143 и miR-155 в висцеральном жире и сыворотке крови у пациенток с алиментарно-конституциональном ожирением и ИР по сравнению с группой контроля. Уровни экспрессии микроРНК достоверно коррелируют с показателями углеводного, липидного обменов и воспаления, что позволяет отнести их к факторам, определяющим эпигенетическое влияние на развитие ИР, при алиментарно-конституциональном ожирении.

Ключевые слова: *микроРНК, ожирение, инсулинорезистентность, сахарный диабет, патогенез.*

Abstract.

There were analyzed results of anthropometry and laboratory tests of 46 females with obesity and insulin resistance, including 10 with diabetes mellitus type 2 and 10 more – the group of control (without obesity and insulin resistance). Valid decreasing of miR-126 expression and increasing of miR-143, miR-155 expression in visceral fat tissue and blood serum was confirmed in patients with alimentary-constitutional obesity and insulin resistance in comparison to the group of control. Levels of microRNA expression correlate with indexes of fat, carbohydrate metabolism, inflammation, that allows to define them as factors which determine epigenetically predisposition for development of insulin resistance in alimentary-constitutional obesity.

Key words: *microRNA, obesity, insulin resistance, Diabetes mellitus, pathogenesis.*

Актуальность. Алиментарно-конституциональное ожирение с абдоминальной локализацией жира является основной причиной развития инсулинорезистентности (ИР), которая играет важную роль в патогенезе сахарного диабета 2 типа (СД 2), а также в кардиометаболическом риске [1]. Между тем не у всех людей с ожирением развивается ИР и СД 2. Не случайно, в последнее время, появилось понятие метаболически «здорового» ожирения [2]. Однако, до настоящего времени идут дискуссии по поводу того, что считать «здоровым» ожирением и почему, некоторые пациенты устойчивы к метаболическим осложнениям, в том числе, таким как ИР [3]. Объяснением этого могут служить индивидуальные молекулярно-генетические особенности обмена веществ и, в частности, предрасположенность к ИР, а также эпигенетические механизмы, влияющие на наследственную информацию, но не связанные с изменением структуры ДНК, а происходящие под влиянием каких-либо внешних факторов [4, 5]. К таким эпигенетическим механизмам относятся и микроРНК. Исследования последних лет показали вовлечённость

определённых микроРНК в нарушение биологических процессов в тканях, в том числе жировой, таких как адипогенез, воспаление и ИР [6, 7].

Целью настоящего исследования было определить экспрессию, ассоциированных с ожирением микроРНК – miR-126, miR-143 и miR-155 в жировой висцеральной ткани и сыворотке крови женщин, и проследить их корреляцию с показателями жирового и углеводного обменов, ИР, воспаления.

Материал и методы. В исследование было включено 46 женщин (основная группа, средний возраст 55,0±1,4 лет) с алиментарно-конституциональным ожирением и ИР (метаболически компрометированные лица), проходивших лечение в хирургическом стационаре и 10 человек (52,0±3,4 года) составили контрольную группу с нормальными массой тела и показателями углеводного обмена. Из 46 женщин у 10 пациенток (57,0±2,3 лет) был установлен диагноз СД 2 типа и 36 человек (54,0±1,7 года) имели ИР в сочетании с нарушенной толерантностью к глюкозе (НТГ) или без неё. Пациенткам всех исследуемых групп была проведена оценка антропометрических параметров (масса тела, рост, индекса массы тела (ИМТ), окружности талии (ОТ) и бедер (ОБ), ОТ/ОБ, а также выполнены лабораторные исследования. Кровь забиралась натощак из кубитальной вены в количестве 5 мл в вакуумную пробирку. Для исследования использовался биохимический анализатор Olympus AU 640. В образце крови оценивались показатели липидного обмена: холестерин (ХС, референсные значения 3,2-5,2 ммоль/л), триглицериды (ТГ, 0,45-1,6 ммоль/л), холестерин липопротеидов низкой плотности (ХС ЛПНП, 2,0-4,0 ммоль/л), холестерин липопротеидов очень низкой плотности (ХС ЛПОНП, 0,26-1,04 ммоль/л), холестерин липопротеидов высокой плотности (ХС ЛПВП, 0,8-2,2 ммоль/л); углеводного обмена: гликемия (референс 3,5-6,0 ммоль/л) и инсулин (3,0-22,0 мкЕД/мл) плазмы натощак, с расчетом HOMA-IR (<2,55 ед), Caro-IR (>0,33); лептин крови (3,7-17,0 нг/мл), адипонектин (8,2-19,1 мкг/мл); ультрачувствительный С-реактивный белок (СРБ, 0,0-3,0 мг/л). Материалом для исследования микро РНК служили интраоперационно полученные пробы висцерального жира, которые сразу после забора помещались в пробирку со стабилизирующим РНК реагентом «RNAlater» и хранились при -20°С, а также сыворотка крови. Образцы жировой ткани предварительно гомогенизировали с лизирующим реактивом. Затем в каждой пробе измеряли количество выделенной микроРНК на спектрофотометре «NanoDrop™ Lite», и пробы подвергали реакции обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени, с использованием праймеров «TaqMan™ MicroRNAAssay», и наборов «RTReverseTranscriptionKit», «PCRMasterMix, noUNG». Расчет экспрессии микроРНК проводился по методу «дельта-дельта Ct, 2-ΔΔCt», а показатели экспрессии у контрольной группы были приняты за единицу.

Статистическая обработка результатов проводилась при помощи программы STATISTICA 10. Данные исследовались на нормальность (Критерий Колмогорова-Смирнова), и после чего использовался конкретный статистический метод. Результаты представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения (M±σ), или медианы и квартилей Me [Q1;Q3]. Статистическая значимость межгрупповых различий количественных данных оценивалась с помощью критериев: Стьюдента (t) – при нормальном распределении, в противном случае – критерия Манна-Уитни (U). Взаимосвязь между количественными признаками оценивалась путем расчета коэффициента корреляции рангов Спирмена (Rs). Критический уровень p-значимости при проверке статистических данных составлял 5%.

Результаты и обсуждение. Согласно результатам, представленным в таблице, достоверных различий по антропометрическим данным между группами компроментированных больных не было. Однако наиболее худшие показатели, отражающие углеводный и липидный обмены среди этих пациенток, были у больных СД 2 ($p1<0,05$), кроме индекса Caro-IR, который был ниже у пациенток с ИР без СД ($p1<0,01$). У них же был выше и уровень лептина ($p1,3<0,01$) и самые низкие ХС ЛПВП по сравнению с контролем ($p2<0,05$), в то же время как уровень адипонектина был ниже у больных СД 2 ($p1,3<0,01$).

Проанализированы результаты определения уровней экспрессии микроРНК в жировой ткани у метаболически компрометированных пациенток по сравнению с лицами контрольной группы, показатели которых были приняты за единицу.

Таблица

Результаты клинического и лабораторного обследования женщин с ИР и СД 2 на фоне ожирения (M±m)

Показатель	Пациентки с ожирением и ИР (n=36)	Пациентки с ожирением и СД 2 типа (n=10)	Группа контроля (n=10)	p
ИМТ,кг/м2	36,3±4,13	34,1±4,64	23,6±2,13	p2<0,01, p3<0,01
ОТ, см	101,4±11,76	103,5±9,22	79,7±5,49	p2<0,01, p3<0,01
ОТ/ОБ	0,89±0,04	0,91±0,03	0,81±0,06	p2<0,05, p3<0,01
Глюкоза, ммоль/л	6,0±0,33	7,2±0,20	5,3±0,31	p1<0,05, p2<0,05 p3<0,01
HbA1c, %	5,8±0,37	6,4±0,58	5,1±0,20	p1<0,05, p2<0,05
Инсулин, мкЕД/мл	19,0±5,96	21,1±9,08	7,4±0,79	p2<0,001, p3<0,001
HOMA-IR, балл	5,1±1,66	6,8±3,01	1,7±0,46	p1<0,05, p2<0,001 p3<0,001
Caro-IR, балл	0,34±0,09	0,49±0,46	0,76±0,22	p1<0,01 p2<0,001 p3<0,001
Лептин, нг/мл	44,0±18,25	38,1±12,23	14,9±4,03	p1<0,01 p2<0,001 p3<0,001
Адипонектин, нг/мл	5,1±2,81	2,2±0,60	12,1±1,33	p1<0,01, p2<0,01 p3<0,01
СРБ, мг/л	31,4±31,51	47,0±38,38	43,6±34,30	все p>0,05
ХС, ммоль/л	4,6±0,86	7,2±0,38	5,7±0,51	p1<0,05, p2<0,05 p3<0,05
ХС ЛПВП, ммоль/л	0,89±0,15	1,09±0,18	1,24±0,14	p2<0,05, p3<0,05
ХС ЛПНП, ммоль/л	2,8±0,80	5,0±0,42	3,8±0,42	p1<0,01, p2<0,01 p3<0,01
ХС ЛПОНП, ммоль/л	0,87±0,16	1,09±0,05	0,62±0,09	p1<0,05, p2<0,01 p3<0,01
ТГ, моль/л	1,9±0,36	2,4±0,11	1,4±0,21	p1<0,05, p2<0,05 p3<0,05

Примечание: p1 – достоверность различий между пациентами с ИР и СД 2, p2 – достоверность различий между пациентами с ИР и контролем, p3 – достоверность различий между пациентами с СД 2 и контролем

Экспрессия miR-126, рассчитанная по $2^{-\Delta\Delta Ct}$, в висцеральном жире в группе метаболически компрометированных лиц была в 4 раза ниже по сравнению с контрольной группой ($p<0,05$). Наиболее низкие значения данной микроРНК были отмечены у больных СД 2 типа (снижение в 14,3 раза), а у пациенток с ИР они были снижены в 3,6 раз (все $p<0,05$). В крови у пациенток основной группы уровень экспрессии miR-126 был снижен относительно показателя контрольной группы в 2,9 раза ($p<0,05$). Экспрессия miR-126 в крови была больше

всего снижена у больных сахарным диабетом 2 типа (в 16,7 раз ниже, чем в контрольной группе), а у пациенток с ИР – только в 2,4 раза (оба $p<0,05$).

Уровень экспрессии miR-143 в висцеральном жире, напротив, у всех пациенток был повышен в 110,4 раза по сравнению с группой контроля. При этом самое высокое её значение было в группе с ИР (повышение в 124,5 раз), а у больных с СД 2 её значения были повышены в 59,5 раз (все $p<0,05$). Изменения этой микроРНК в крови были менее значимы. Так в группе метаболически компрометированных лиц уровень экспрессии miR-143 в сыворотке крови превышал показатель контрольной группы только в 48,2 раза ($p<0,05$). При этом различий экспрессия miR-143 у больных СД 2 и ИР не было (соответственно выше чем в контроле в 40 раз и в 50,5 раз; оба $p<0,05$).

У метаболически компрометированных больных по сравнению с лицами контрольной группы уровень экспрессии miR-155 в висцеральном жире был в 66,1 раз выше ($p<0,05$). Уровень данной микроРНК был самым высоким у больных СД 2 типа (повышение в 119,5 раз), а у пациенток с ИР и без диабета значения её были повышены в 51,2 раза (все $p<0,05$). Уровень экспрессии miR-155 в сыворотке крови, у метаболически компрометированных лиц превышал показатель контрольной группы только в 11,8 раз ($p<0,05$). Экспрессия miR-155 в крови у больных СД 2 была в 42,5 раза выше, чем в контрольной группе, а у пациентов с ИР - только в 7,6 раз (оба $p<0,05$).

Анализ корреляции антропометрических и лабораторных показателей с уровнями экспрессии микроРНК выявил у метаболически компрометированных пациентов наличие средней и слабее средней отрицательной корреляции miR-126 в висцеральном жире с ОТ/ОБ ($Rs = -0,33$; $p < 0,02$), глюкозой ($Rs = -0,59$; $p < 0,001$), HbA1c ($Rs = -0,38$; $p < 0,01$), HOMA-IR ($Rs = -0,28$; $p < 0,05$), лептином ($Rs = -0,48$;$p < 0,001$), ХС ($Rs =-0,43$; $p < 0,002$), ХС ЛПНП ($Rs = -0,42$; $p < 0,002$), ХС ЛПОНП ($Rs = -0,50$; $p < 0,001$), ТГ($Rs = -0,50$; $p < 0,001$) и выше средней с СРБ ($Rs = -0,63$; $p < 0,005$) и среднюю положительную с адипонектином ($Rs =0,44$; $p < 0,002$) и ХС ЛПВП ($Rs =0,41$; $p < 0,005$). Корреляция этих биохимических показателей с экспрессией miR-126 в сыворотке крови была аналогичной, полученной с висцеральным жиром. Однако обратная ивзаимосвязь с СРБ была более высокой ($Rs = -0,71$; $p < 0,001$). Значимых корреляций уровня экспрессии miR-126 с изученными антропометрическими и лабораторными показателями в группах пациенток с ИР и СД 2 типа выявлено не было.

У метаболически компрометированных пациенток было установлено в висцеральном жире наличие прямой средней корреляции miR-143 с ИМТ ($Rs =0,37$; $p < 0,01$), глюкозой ($Rs =0,43$; $p < 0,002$) и СРБ ($Rs =0,48$; $p < 0,05$). Более выраженные взаимосвязи экспрессии miR-143 у них были отмечены в сыворотке крови со следующими показателями – ИМТ ($Rs = 0,56$; $p >0,001$), ОТ/ОБ ($Rs = 0,55$; $p < 0,001$), с лептином ($Rs = 0,45$; $p < 0,02$) и СРБ ($Rs = 0,75$; $p < 0,001$). В группе пациенток с ИР уровень экспрессии miR-143 в жировой ткани коррелировал с концентрацией инсулина ($Rs =0,42$; $p < 0,02$), с HOMA-IR ($Rs = 0,40$; $p < 0,02$), с адипонектином ($Rs = -0,40$; $p < 0,02$), ХС ЛПВП ($Rs = -0,37$; $p < 0,05$), ХС ЛПОНП ($Rs = 0,39$; $p < 0,02$) и ТГ ($Rs = 0,39$; $p < 0,02$). У пациенток этой же группы выявлены статистически достоверные корреляции экспрессии miR-143 в сыворотке крови со следующими антропометрическими и лабораторными показателями – ИМТ ($Rs = 0,54$; $p >0,001$), ОТ/ОБ ($Rs = 0,74$; $p < 0,001$), с лептином ($Rs = 0,41$; $p < 0,02$), адипонектином ($Rs = -0,46$; $p < 0,005$), ХС ЛПВП ($Rs = -0,34$; $p < 0,05$), ХС ЛПОНП ($Rs = 0,43$; $p < 0,01$), ТГ ($Rs = 0,44$; $p < 0,01$) и СРБ ($Rs = 0,93$; $p < 0,001$). У больных СД 2 типа корреляция уровня экспрессии miR-143 в сыворотке крови была только с лептином и составила $Rs = 0,88$ ($p < 0,001$).

Взаимосвязь экспрессии miR-155 в висцеральном жире в группе метаболически компрометированных пациенток была обнаружена с глюкозой ($Rs = 0,51$; $p < 0,001$), HbA1c ($Rs = 0,35$; $p < 0,02$), с лептином ($Rs = 0,50$; $p < 0,001$), с адипонектином ($Rs = -0,43$; $p < 0,002$), с ХС ($Rs =0,38$; $p < 0,01$) и ХС ЛПВП ($Rs = -0,39$; $p < 0,01$), ХС ЛПНП ($Rs = 0,33$; $p < 0,02$), ХС ЛПОНП ($Rs = 0,50$; $p < 0,001$), ТГ ($Rs = 0,50$; $p < 0,001$). Корреляция этих биохимических показателей с экспрессией miR-155 в сыворотке крови была аналогичной, полученной с

висцеральным жиром. При этом наиболее выраженная взаимосвязь была отмечена у больных СД 2. Так экспрессия miR-155 в крови у них коррелировала с лептином ($Rs = 0,85$; $p < 0,005$), с адипонектином ($Rs = -0,67$; $p < 0,05$), ХС ЛПОНП ($Rs = 0,74$; $p < 0,02$), ТГ ($Rs = 0,74$; $p < 0,02$) и СРБ ($Rs = 0,64$; $p < 0,05$).

Выявленное снижение содержания miR-126 у метаболически компрометированных пациенток, возможно, связано с нарушением в субстрате инсулинового рецептора IRS-1, регулирующего гомеостаз глюкозы и инсулина в клетках поджелудочной железы, печени, а также адипоцитах, обеспечивая их метаболизм и выживание. Уменьшение miR-126 в крови объясняют и снижением экспрессии генов, вовлечённых в глюконеогенез и защиту от оксидативного стресса. Так по данным A. Zampetaki и соавт. (2010), концентрация данной микроРНК у здоровых людей значительно выше, чем у больных СД 2, что совпадает с полученными нами результатами [6].

Согласно литературным данным miR-143 участвует в контроле дифференцировки адипоцитов. Исследования показали, что эта микроРНК в большом количестве экспрессируется в жировой ткани и печени при ИР, индуцированной ожирением [7]. Наши данные, показавшие наиболее выраженные корреляционные взаимосвязи данной микроРНК с антропометрическими и лабораторными показателями у больных с ИР, подтверждают это мнение.

Одним из ключевых регуляторов развития воспаления в жировой ткани является miR-155. По данным этих авторов, схожих с нашими, концентрация miR-155 коррелирует с уровнем лептина в крови, что позволяет считать её молекулярно генетическим маркёром ИР [8].

Заключение. Таким образом, показано, что изменение экспрессии микроРНК, ассоциированных с висцеральным ожирением, оказывает разнонаправленное действие на адипогенез и чувствительность к инсулину. Результаты проведенного исследования диагностировали достоверно пониженную экспрессию miR-126, особенно при СД 2, и повышенную экспрессию miR-143, в большей степени при ИР и miR-155, более выраженную при СД 2, в жировой ткани и в сыворотке крови у больных с алиментарно-конституциональным ожирением (висцеральная форма) и инсулинорезистентностью по сравнению с метаболически не компрометированными пациентками. Уровни экспрессии микроРНК достоверно коррелируют с показателями липидного, углеводного обменов и воспаления, что позволяет отнести их к факторам, определяющим эпигенетическое влияние на развитие ИР, при алиментарно-конституциональном ожирении.

Список литературы:

1. Кологривова, И.В. Висцеральное ожирение и кардиометаболический риск: особенности гормональной и иммунной регуляции / И.В. Кологривова, И.В. Винницкая, О.А. Кошельская, Т.Е. Суслова Ожирение и метаболизм // 2017. Т. 14, № 3. С. 3-10. DOI: 10.14341/omet201733-10
2. Распространенность метаболически здорового ожирения по данным эпидемиологического обследования выборки 45–69 лет г. Новосибирска / С.В. Мустафина, Л.В. Щербакова, Д.А. Козупеева, С.К. Малютина, Ю.И. Рагино, О.Д. Рымар // Ожирение и метаболизм. 2018. Т. 15, № 4. С. 31-37.
3. Романцова, Т.И. Метаболически здоровое ожирение: дефиниции, протективные факторы, клиническая значимость / Т.И. Романцова, Е.В. Островская // Альманах клин. мед. 2015. № 1. С.75–86. DOI:10.18786/2072-0505-2015-1-75-86.
4. Суплотова, Л.А. Клинико-метаболические и молекулярно-генетические ассоциации у женщин репродуктивного возраста при инсулинорезистентности, ожирении и метаболическом синдроме / Л.А. Суплотова, С.А. Сметанина, Н.В. Плотников, К.А. Мурычева // Медицинская наука и образование Урала. 2013. Т. 14., № 2(74). С. 84-87.

5. Щербо, С.Н. Биомаркёры персонализированной медицины. Некодирующие РНК и микроРН / С.Н. Щербо, Д.С. Щербо, М.Ю. Кралин // Медицинский алфавит. 2015. № 11. С. 5-11.
6. Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial miR-126 and other microRNAs in type 2 diabetes / A. Zampetaki, S. Kiechl, I. Drozdov, P. Willeit, U. Mayr, M. Prokopi, A. Mayr, S. Weger, F. Oberhollenzer, F. Bonora, A. Shah, J. Willeit, M. Mayr // Circ. Res. 2010. № 107. P. 810-817. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.110.226357.
7. MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation / C. Esau, X. Kang, E., Peralta E. Hanson, E.G. Marcusson, L.V. Ravichandran, Y. Sun, S. Koo, R.J. Perera, R. Jain, N.M. Dean, S.M. Freier, C.F. Bennett., B. Lollo, R. Griffey // Biol.Chem.J. 2004. № 2. P. 52361-52365. DOI: 10.1074/jbc.C400438200
8. Dysregulated of microRNA-155 expression in peripheral blood mononuclear cells from patients with type 2 diabetes / N.E. Corral-Fernández, M. Salgado-Bustamante, M.E. Martínez-Leija, N. Cortez-Espinosa, M.H. García-Hernández, E. Reynaga-Hernández, R. Quezada-Calvillo, D.P. Portales-Pérez // Experimental and clinical endocrinology&diabetes 2013. № 121. P. 347-353. DOI: 10.1055/s-0033-1341516