

На правах рукописи

Побожева Ирина Александровна

**РОЛЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ АДИПОНЕКТИНА И
ОМЕНТИНА 1 В ЭПИКАРДИАЛЬНОЙ ЖИРОВОЙ ТКАНИ В РАЗВИТИИ И
ТЕЧЕНИИ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА**

1.5.7. Генетика (биологические науки)

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Уфа– 2023

Работа выполнена в лаборатории медицинской генетики отдела молекулярно-генетических и нанобиологических технологий НИЦ ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава России и в лаборатории молекулярной генетики человека отдела молекулярной и радиационной биофизики ФГБУ Петербургского института ядерной физики им. Б. П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт».

Научный руководитель:

Пчелина Софья Николаевна доктор биологических наук

Официальные оппоненты:

Мешков Алексей
Николаевич, доктор
медицинских наук руководитель лаборатории
молекулярной генетики Федерального
государственного бюджетного
учреждения «Национальный
медицинский исследовательский центр
терапии и профилактической медицины»
Министерства здравоохранения
Российской Федерации

Гареева Анна Эмировна доцент, ведущий научный сотрудник
доктор биологических наук лаборатории молекулярной генетики
человека Института биохимии и генетики –
обособленного структурного
подразделения Федерального
государственного бюджетного научного
учреждения Уфимского федерального
исследовательского центра Российской
академии наук.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное
учреждение «Национальный медицинский
исследовательский центр имени В. А.
Алмазова» Министерства здравоохранения
Российской Федерации, г. Санкт-
Петербург.

Защита диссертации состоится «6» декабря 2023 г. в «10.00» часов на заседании Диссертационного совета 24.1.218.01 при Уфимском федеральном исследовательском центре Российской академии наук по адресу: 450054, г. Уфа, пр. Октября, 71, конференц-зал ИБГ УФИЦ РАН (ком. № 406). С диссертацией можно ознакомиться на сайтах ВАК РФ (<https://vak.minobrnauki.gov.ru>) и УФИЦ РАН (<http://ufaras.ru>). Автореферат разослан «__» _____ 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
24.1.218.01 доктор биологических наук, доцент

Гульназ Фаритовна Корытина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Ишемическая болезнь сердца (ИБС) является распространенным сердечно-сосудистым заболеванием (ССЗ) в большинстве развитых стран, включая Российскую Федерацию (Крюков и другие, 2010). В настоящее время считается, что атеросклероз коронарных артерий является основной причиной развития ИБС (Сергиенко и другие, 2020; Латфуллин, 2017).

Одним из наиболее значимых факторов риска развития атеросклероза является ожирение и, связанная с ним, дисфункция жировой ткани (ЖТ). ЖТ является активным эндокринным органом, отвечающим за секрецию адипокинов. Адипокины регулируют углеводный и липидный метаболизм, чувствительность тканей к инсулину, свертываемость крови и воспалительные реакции (Agra et al., 2014; Chistiakov et al., 2017).

Развитие сопутствующих заболеваний связано с особенностями анатомического распределения ЖТ при ожирении (Сергиенко и другие, 2020; Mendis et al., 2011). Наиболее опасными являются абдоминальное ожирение, для которого характерно присутствие большого объема висцеральной жировой ткани в интраабдоминальной области (ИЖТ) и эпикардальное, характеризующееся разрастанием эпикардальной жировой ткани (ЭЖТ), расположенной в непосредственной близости к миокарду и прилегающим коронарным артериями. Вследствие общего кровоснабжения ЭЖТ и миокарда, ЭЖТ может оказывать местное воздействие на коронарное русло через паракринные и вазокринные механизмы (Chistiakov et al., 2017; Iacobellis et al., 2005).

Адипонектин и оментин-1 являются одними из важнейших антиатерогенных адипокинов, секретируемых ЖТ. Снижение их концентрации в сыворотке крови наблюдается при ожирении, сахарном диабете и сердечно-сосудистых заболеваниях (Li et al., 2009; Беляева и другие, 2014; Cătoi et al., 2014; Onur et al., 2014).

Оментин-1 обладает противовоспалительным, антиатерогенным и антиоксидантным эффектами, стимулирует инсулин-опосредованный транспорт глюкозы в адипоцитах человека (Lau et al., 2017; Du et al., 2016).

Адипонектин циркулирует в крови в виде тримера, гексамера и мультимера. Мультимер адипонектина, т.е. высокомолекулярный адипонектин (ВМАН), имеет наибольшую биологическую активность (Rutkowski et al., 2014). Адипонектин регулирует энергетический гомеостаз, участвуя в метаболизме жирных кислот и глюкозы, оказывает противовоспалительное, антидиабетическое и антиатерогенное действие, взаимодействуя с рецепторами AdipoR1 и AdipoR2 и инициируя активацию ряда внутриклеточных сигнальных каскадов. (Karbowska et al., 2006; Villarreal-Molina et al., 2012). Остается актуальным поиск новых терапевтических подходов к

профилактике и лечению атеросклероза, в связи с чем одним из направлений современных исследований является изучение соединений, усиливающих функции адипонектина.

Однако, в настоящий момент не ясно, какой тип ЖТ вносит основной вклад в пул адипонектина и оментина-1 в сыворотке крови в норме и патологии, а исследования остаются единичными в связи с трудностью получения парных образцов материала.

Мы предположили, что изменение экспрессии генов адипонектина (*ADIPOQ*) и оментина-1 (*ITLNI*), секретируемых как висцеральной, так и подкожной жировой тканью (ПЖТ) может оказывать влияние на развитие ИБС.

Степень разработанности темы

Известно, что ожирение является независимым фактором риска ССЗ. При этом в ряде исследований был показан существенный вклад локальных жировых депо в патогенез атеросклероза и ССЗ (Katta et al., 2021; Jahangir et al., 2014; Piché et al., 2018). Продолжается изучение роли адипокинов, в развитие ожирения и ИБС (Lau et al., 2017; Iacobellis et al., 2015; Agra et al, 2014; Chistiakov et al, 2017). При этом особое внимание уделяется изучению висцеральной жировой ткани (ВЖТ), в частности, ЭЖТ. Адипокины ЭЖТ могут быть локально вовлечены в регуляцию воспалительных и атерогенных процессов в стенках коронарных артерий. Однако, подобные исследования остаются единичными в связи с трудностью получения парных образцов материала, а результаты во многом противоречивы (Gaborit et al., 2017; Ansaldo, 2019; Chistiakov et al., 2017; Iacobellis et al., 2005).

Актуальным также является поиск соединений, усиливающих функции антиатерогенных адипокинов. В частности, исследователями было проведено изучение адипорона, низкомолекулярного агониста рецепторов адипонектина (Okada-Iwabu, 2015; Zhang et al, 2015). Однако, большинство исследований было проведено на моделях мышей и иммортализованных клеточных линиях.

Цель исследования:

Исследование взаимосвязи экспрессии генов адипонектина и оментина-1 в эпикардиальной, интраабдоминальной и подкожной жировой ткани с развитием ожирения и ИБС.

Задачи, решаемые в ходе исследования:

1. Оценка уровня мРНК генов адипонектина (*ADIPOQ*) и оментина-1 (*ITLNI*) в парных образцах интраабдоминальной и подкожной жировой ткани у пациентов с ожирением и в группе сравнения.
2. Оценка экспрессии генов *ADIPOQ* (мРНК, ВМАН) и *ITLNI* (мРНК, белок) в парных образцах эпикардиальной и подкожной жировой ткани у пациентов с ИБС и в группе сравнения.

3. Сопоставление уровня экспрессии вышеуказанных генов в различных типах жировой ткани.
4. Сопоставление полученных данных с клиническими и биохимическими характеристиками пациентов: пол, возраст, индекс массы тела и окружность талии, концентрация липидов, адипонектина и оментина-1 в сыворотке крови, количество пораженных артерий, толщина эпикардальной жировой ткани.
5. Оценка влияния агониста рецепторов адипонектина адипорона на экспрессию генов обратного транспорта холестерина *ABCA1*, *ABCG1*, *APOA1*, *LXRα (NR1H3)*, *LXRβ (NR1H2)*, *PPARG*, *ACAT1*, *IL6*, *TNFA*, *TLR4* в клетках первичной культуры макрофагов человека.

Научная новизна

Впервые была проведена оценка относительного уровня ВМАН в парных образцах ЭЖТ и ПЖТ у пациентов с ИБС и пациентов без атеросклеротического поражения коронарных артерий и показано, что содержание ВМАН в ЭЖТ снижено при толщине ЭЖТ более 8 мм, а уровень ВМАН в ПЖТ ниже у пациентов с ИБС, чем у обследованных без признаков клинически значимого атеросклероза коронарных артерий, что согласуется со снижением уровня мРНК гена *ADIPOQ* в данной группе пациентов.

Оценка уровня оментина-1 в парных образцах ЭЖТ и ПЖТ выявила низкий уровень белка оментина-1 в ЭЖТ у лиц с избыточной массой тела, как у пациентов с ИБС, так и в группе сравнения, а также отрицательную корреляцию уровня мРНК гена *ITLN1* и белка оментина-1 в ЭЖТ с ИМТ.

Впервые изучено влияние агониста рецепторов адипонектина адипорона на экспрессию генов обратного транспорта холестерина *ABCA1*, *ABCG1*, *APOA1*, *LXRα (NR1H3)*, *LXRβ (NR1H2)*, *PPARG*, *ACAT1*, *IL6*, *TNFA*, *TLR4* в первичной культуре макрофагов и показано повышение уровня мРНК генов *ABCA1* и *PPARG* при концентрациях 5, 10 мкМ.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты, полученные в ходе проведения данного исследования, позволяют расширить представления о значении адипокинов адипонектина и оментина-1 жировой ткани в развитии ИБС.

Сниженная концентрация общего и высокомолекулярного адипонектина и оментина-1 в сыворотке крови пациентов с ИБС, а также их корреляция с индексом массы тела подтверждает представления об антиантерогенной роли данных адипокинов в патогенезе ССЗ.

Было показано снижение концентрации высокомолекулярного адипонектина в сыворотке крови, а также экспрессии гена адипонектина и снижение уровня

высокомолекулярного адипонектина в ПЖТ у пациентов с ИБС. В то же время, разрастание ЭЖТ до 8 мм у пациентов с ИБС характеризовалось снижением высокомолекулярного адипонектина в эпикардальной жировой ткани. Полученные данные могут говорить о потенциальной значимости именно мультимерных форм адипонектина на развитие ИБС.

Проведенное впервые исследование влияния агониста рецепторов адипонектина адипорона на экспрессию генов обратного транспорта холестерина позволило расширить представления о воздействии адипорона как на первичную культуру макрофагов человека, так и на макрофаги линии THP-1. Полученные данные вносят вклад в исследования соединений, усиливающих эффекты адипонектина и их потенциальное влияние на развитие атеросклероза.

Методология и методы исследования

Исследование роли экспрессии генов адипонектина и оментина-1 в эпикардальной, интраабдоминальной и подкожной жировой ткани, а также изучение влияния адипорона на экспрессию генов липидного обмена и воспаления в первичной культуре макрофагов человека проводилось с использованием современных генетических и биохимических методов. В частности, применялись такие методы как полимеразная цепная реакция в режиме реального времени (ПЦР), вестерн-блоттинг, иммуноферментный анализ (ИФА).

Положения, выносимые на защиту

1. Для пациентов с ИБС характерно снижение экспрессии гена адипонектина и уровня высокомолекулярного адипонектина в подкожной жировой ткани.
2. Разрастание эпикардальной жировой ткани до 8 мм и более характеризуется снижением в ней уровня высокомолекулярного адипонектина.
3. Избыточная масса тела ассоциирована со снижением уровня оментина-1 в эпикардальной жировой ткани, у женщин - со снижением мРНК гена адипонектина в подкожной жировой ткани.
4. Воздействие адипорона в концентрации 5 и 10 мкМ на клетки первичной культуры макрофагов человека приводит к повышению экспрессии генов *PPARG* и *ABCA1*.

Степень достоверности результатов

Степень достоверности и обоснованности положений, выносимых на защиту, представленных в диссертации, обеспечена применением адекватных и современных биохимических, молекулярно-генетических и клинических методов, выбором корректных статистических методов для исследуемых выборок для обработки полученных результатов исследований.

Апробация работы

Материалы диссертации были доложены на российских и международных научных мероприятиях: Зимняя молодежная школа ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии (Гатчина, Россия, 2017); European Human Genetics Conference (Copenhagen, Denmark, 2017); Future of Biomedicine (Владивосток, Россия, 2017); IV ежегодный молодежный научный форум Open Science (Гатчина, Россия, 2017); Зимняя молодежная школа ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии (Гатчина, Россия, 2018); European Atherosclerosis Society Congress (Lisbon, Portugal, 2018); V ежегодный молодежный научный форум Open Science (Гатчина, Россия, 2018); Зимняя молодежная школа ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии (Санкт-Петербург, Россия, 2019); Зимняя молодежная школа ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии (Санкт-Петербург, Россия, 2020); IX съезд Российского общества медицинских генетиков European Atherosclerosis Society Congress (Helsinki, Finland, 2021); IX съезд Российского общества медицинских генетиков (Россия, Москва, 2021); VI Российский Конгресс с международным участием «Молекулярные основы клинической медицины – возможное и реальное» (Россия, Санкт-Петербург, 2022); Российский национальный конгресс кардиологов (Казань, Россия, 2022); III объединенный научный форум физиологов, биохимиков и молекулярных биологов (Россия, Сочи, 2022).

Личный вклад автора в проведение исследований

Наблюдение и клинический осмотр пациентов, эхокардиографическое и коронароангиографическое исследования проводились на кафедре факультетской терапии с курсом эндокринологии, кардиологии и функциональной диагностики ПСПбГМУ им. акад. И.П.Павлова, определение биохимических характеристик сыворотки крови и концентрации общего адипонектина и оментина-1 в сыворотке крови проводился сотрудниками кафедры клинической лабораторной диагностики ПСПбГМУ им. акад. И.П.Павлова. Определение концентрации ВМАН в сыворотке крови пациентов с ИБС и группы сравнения методом ИФА, относительного уровня мРНК генов адипонектина и оментина-1 в ЭЖТ и ПЖТ методом ПЦР, а также относительного уровня белка ВМАН и оментина-1 в ЭЖТ и ПЖТ методом вестерн-блоттинг был выполнен автором лично. Автором лично выполнено исследование воздействия адипорона на первичную культуру макрофагов человека и макрофаги ТНР-1: выделение мононуклеарной фракции периферической крови здоровых доноров в градиенте плотности фиколла, культивирование первичной культуры макрофагов и макрофагов ТНР-1 с последующим воздействием адипорона, проведение теста на выживаемость клеток, определение относительного уровня мРНК генов липидного обмена и воспаления методом ПЦР. Определение концентрации адипонектина в

сыворотке крови у женщин с избыточной массой тела и ожирением и группы сравнения методом иммуноферментного анализа (ИФА), относительного уровня мРНК генов адипонектина и оментина-1 в ПЖТ и ИЖТ методом ПЦР в режиме реального времени был выполнен автором лично. Статистическая обработка полученных данных была выполнена автором лично. Описание исследований, анализ и обсуждение результатов были выполнены автором самостоятельно. Совместно с соавторами и научным руководителем обсуждались все материалы, освещенные в данном исследовании, были сформулированы выводы.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертация соответствует паспорту специальности 1.5.7. – Генетика (биологические науки), охватывающей изучение явлений изменчивости и наследственности, закономерностей процессов хранения, передачи и реализации генетической информации на молекулярном, клеточном уровнях. Область исследования: «Генетика человека. Медицинская генетика. Болезни с наследственной предрасположенностью».

Публикации

По материалам диссертационного исследования было опубликовано 7 работ, в том числе 6 статей в изданиях из утвержденного Высшей аттестационной комиссией при Минобрнауки России перечня рецензируемых научных изданий, рекомендованных для публикации основных результатов диссертационных исследований для соискания ученой степени кандидата биологических наук (4 из них в Web of Science и/или Scopus).

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения, выводов, заключения, списка сокращений и списка литературы (243 источник, из них 214 – зарубежные, 29 – российские). Работа изложена на 120 страницах машинописного текста, иллюстрирована 9 таблицами, 35 рисунками.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

С первой по третью часть обзора литературы подробно рассмотрен патогенез ожирения и ИБС. В четвертой части обзора литературы приведены современные данные о структуре, функциях и сигнальных путях адипонектина и оментина-1 и описана их роль в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы исследования

В первую выборку вошли 50 женщин (средний возраст $46,79 \pm 10,98$ лет) для оценки относительного уровня мРНК генов *ITLN1* и *ADIPOQ* в парных образцах ИЖТ и ПЖТ. В соответствии с критериями ВОЗ все обследованные были разделены на две группы по значениям ИМТ: лица с избыточной массой тела и ожирением ($n=34$, ИМТ $32,33 \pm 7,07$) и индивидуумы с нормальной массой тела ($n=16$, ИМТ $21,42 \pm 2,45$). Образцы ИЖТ и ПЖТ были получены при проведении плановых операций на брюшной полости. Также были измерены биохимические показатели в сыворотке крови.

Во вторую выборку вошли 74 пациента с ИБС, перенесших операцию коронарного шунтирования (55 мужчин, 19 женщин, средний возраст $61,8 \pm 8,5$ лет) и 16 пациентов, оперированных по поводу клапанных пороков сердца без признаков ИБС и атеросклеротического поражения коронарных артерий (8 мужчин и 8 женщин, средний возраст $67,6 \pm 15,3$ года). Все пациенты с ИБС регулярно получали терапию антиагрегантами, бета-адреноблокаторами, ингибиторами АПФ/сартанами и ингибиторами ГМГ-КоА-редуктазы в соответствии с отечественными и зарубежными рекомендациями (Бокерия и другие, 2013). Были получены образцы ЭЖТ и ПЖТ, а также сыворотки периферической крови.

Общий дизайн исследования «случай-контроль» представлен на рисунке 1. Для исследования эффект адипорона на экспрессию генов обратного транспорта холестерина была использована клеточная линия моноцитарного лейкоза человека ТНР-1 (ЦКП «Коллекция клеточных культур позвоночных» Института цитологии РАН), а также первичные макрофаги, полученные из образцов (30 мл) периферической крови 3 здоровых доноров.

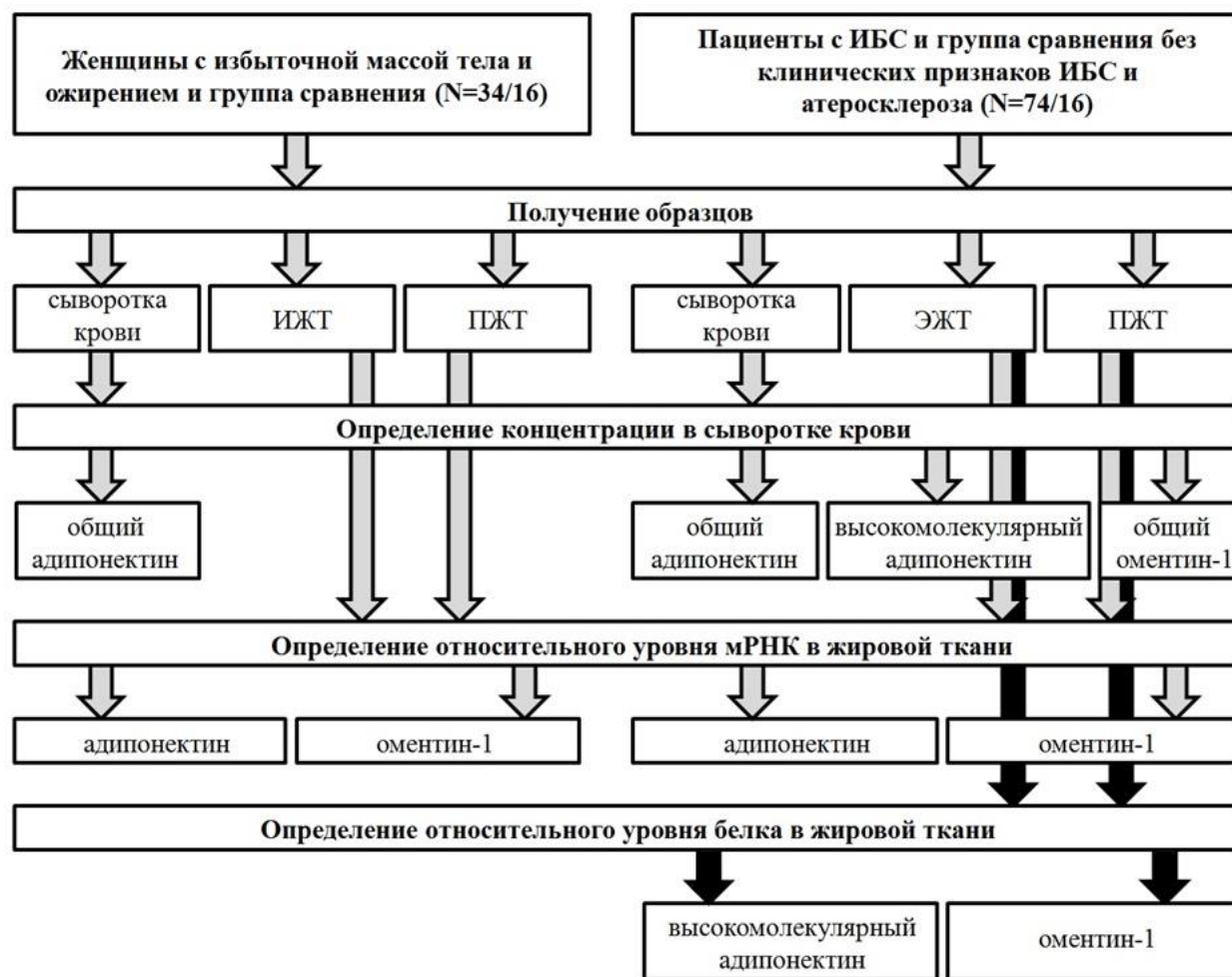


Рисунок 1. Дизайн исследования

Методы исследования

Полученные образцы тканей замораживали в жидком азоте и хранили при температуре $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Образцы крови центрифугировали при 3000 об / мин в течение 20 минут для получения сыворотки крови. Далее образцы сыворотки отбирались в стерильные микропробирки и помещались в морозильную камеру ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Коронароангиография была выполнена всем обследованным с целью подтверждения и оценки степени тяжести атеросклероза коронарных артерий или для доказательства отсутствия атеросклеротического поражения коронарных артерий. Толщину ЭЖТ измеряли методом эхокардиографии (ЭХО). Эхокардиографическое исследование было выполнено на ультразвуковом сканере экспертного класса GE VIVID 7 Dimension. Основные эхокардиографические показатели оценивали фазированным матричным секторным датчиком M4S. Измерения ЭЖТ проводили в трех точках и оценивали толщину в миллиметрах: над верхушкой сердца, над свободной стенкой правого желудочка и в венечной борозде с дальнейшей оценкой среднего значения.

Концентрацию общего и высокомолекулярного адипонектина, а также оментина-1 в сыворотке крови измеряли методом ИФА с использованием наборов ELISA (BioVendor, Чехия для общего адипонектина, Alpcos, США для ВМАН и RayBiotech, США для оментина-1)

Для выделения тотальной РНК из биоптатов ЭЖТ, ПЖТ и ИЖТ был использован набор RNeasyMiniKit (Qiagen, США). кДНК была получена методом обратной транскрипции с использованием набора RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, США).

Определение уровня мРНК генов *ADIPOQ* и *ITLN1* проводили на приборе CFX96 (Biorad, США) методом количественной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с флуоресцентными зондами TaqMan. В качестве референсных были использованы конститутивно экспрессирующиеся в клетках гены «домашнего хозяйства»: *ACTB* и *RPLP0*.

Уровень ВМАН и оментина-1 в ЭЖТ и ПЖТ определяли методом вестерн-блот. Концентрацию общего белка определяли по методу Бредфорд на планшетном спектрофотометре BioRadxMark (США). Были использованы первичные поликлональные антитела кролика для детекции адипонектина (1:100; Almbion, Россия), β-актина (1:1000; NB600-503, NovusBiologicals, США), и оментина-1 (1:2000; AB10627, Thermo Fisher Scientific, США), а также вторичные антикроличьи антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (1:3000; ab6721, Abcam, Великобритания).

Первичные макрофаги получали путем дифференцировки моноцитов. Мононуклеарную фракцию получали методом центрифугирования в градиенте плотности фиколла ($\rho=1.077$, Corning, США). Мононуклеарные клетки ресуспендировали в культуральной среде (Alpha MEM (Биолот, Россия), 10% аутологичная сыворотка человека, 1% антибиотика (гентамицин)) и инкубировали в 24-луночных планшетах в концентрации 2×10^5 на лунку в инкубаторе с 5 % CO₂ при +37°C в течение 2 ч. После чего клетки промывали в PBS. Прикрепившиеся к чашкам Петри моноциты культивировали в течение 5 суток с заменой питательной среды на 1 и 3 сутки. Полученные клетки инкубировали в течение суток в культуральной среде, содержащей различные концентрации адипорона (Sigma-Aldrich, США): 0, 5, 10 и 20 мкМ (концентрации адипорона были определены после проведения теста на выживаемость клеток). После инкубации клетки отмывали в PBS и использовали для выделения РНК с помощью набора Gene JET RNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, США). кДНК была получена с помощью обратной транскрипции с использованием набора MMLV RT kit (Евроген, Россия).

Клетки моноцитарного лейкоза человека *THP-1* культивировали в среде RPMI 1640 с добавлением 10 % FBS, 2 mM L-глутамина, и 1 % антибиотика (гентамицин) при

37 °C в инкубаторе с 5 % CO₂. Для дифференцировки в макрофаги клетки были рассажены на 24-луночные планшеты в концентрации 5×10^5 на лунку. Дифференцировка моноцитов THP-1 в макрофаги была проведена с помощью обработки фоболовым эфиром (Novus Biologicals, США) в концентрации 50 нг/мл в течение 24 часов.

MTS тест на выживаемость клеток проводили с помощью набора CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, США). Жизнеспособность клеток определяли путем измерения оптической плотности при 490 нм на спектрофотометре BioRadxMark (США).

Определение уровня мРНК генов ABCA1, ABCG1, APOA1, ACAT1, IL6, LXRA (NR1H3), LXRβ (NR1H2), PPARG, TNFA, TLR4 проводили аналогично методу определения уровня мРНК генов *ADIPOQ* и *ITLN1*, описанному выше.

Статистическая обработка полученных результатов выполнялась в программе SPSS 23.0 для Windows. Соответствие данных нормальному распределению проверялось с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. В случае соответствия данных нормальному распределению (большинство клинических и биохимических характеристик пациентов) использовали t-критерий Стьюдента, в случае ненормального распределения – U-критерий Манна–Уитни. Также использовали критерий Спирмена и методы однофакторного дисперсионного анализа и линейного корреляционного анализа. Статистический анализ различий между сравниваемыми группами выполняли с использованием H-критерия Краскела-Уоллиса с последующим попарным сравнением методом Данна. Результаты представлены как средние значения ± стандартное отклонение или медиана (мин – макс). Критический уровень достоверности принимали равным 0,05.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика обследуемых групп

Характеристика обследуемых групп пациентов и групп сравнения представлена в таблице 1. У всех женщин с избыточным весом и ожирением наблюдали проявления атерогенной дислипидемии. Пациенты с ИБС и группы сравнения были сопоставимы по возрасту, однако в группе обследованных с ИБС преобладали мужчины (74%).

Таблица 1. Характеристика обследуемых групп

	Женщины с избыточной массой тела и ожирением (N=34)	Женщины с нормальной массой тела (N=16)	Пациенты с ИБС (N=74)	Группа сравнения (N=16)
Возраст, лет	50,5±9,2	38,6±10,8	61,8±8,5	67,6±15,3
ИМТ, кг/м ²	32,33±7,07**	21,42±2,45**	28,5±4,4	25,5±4,1
Окружность талии, см	101±14**	76±9**	98±9	86±14
Общий ХС, ммоль/л	5,77±1,46*	4,6±0,89*	4,8±1,4	4,6±1,0
ХС-ЛПНП, ммоль/л	3,64±1,24*	2,76±0,88*	2,6±1,4	2,8±0,5
ХС-ЛПОНП, ммоль/л	-	-	0,8±0,4	0,7±0,4
ХС-ЛПВП, ммоль/л	1,24±0,36	1,52±0,33	1,4±0,6	1,2±0,4
ТГ, ммоль/л	1,79±0,85	1,39±0,71	1,7±0,9*	1,4±0,9*
Толщина ЭЖТ, мм	-	-	6,5±2,5	5,3±1,9

** p<0,001, *p<0,05

Экспрессия гена адипонектина в различных типах жировой ткани при ожирении и ИБС

Концентрация адипонектина в сыворотке крови пациентов с ИБС и ожирением

У пациентов с ИБС отмечается снижение как общего, так и высокомолекулярного адипонектина в сыворотке крови (p<0,05 и p<0,05, соответственно). При этом концентрация общего адипонектина и ВМАН в сыворотке крови были ниже у мужчин по сравнению с женщинами (p<0,05 и p<0,05, соответственно) (Рисунок 2, 3). Концентрация общего адипонектина положительно коррелировала с концентрацией ВМАН в сыворотке крови у пациентов с ИБС (p<0,01, r=0,609). Концентрация адипонектина в сыворотке крови у лиц женского пола с ожирением и избыточной массой тела не отличалась от группы сравнения (p>0,05).

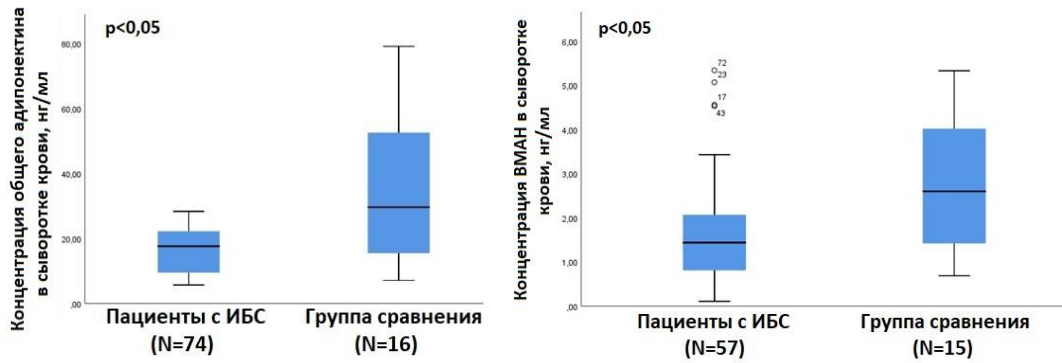


Рисунок 2. Концентрация общего адипонектина и ВМАН у пациентов с ИБС и в группе сравнения

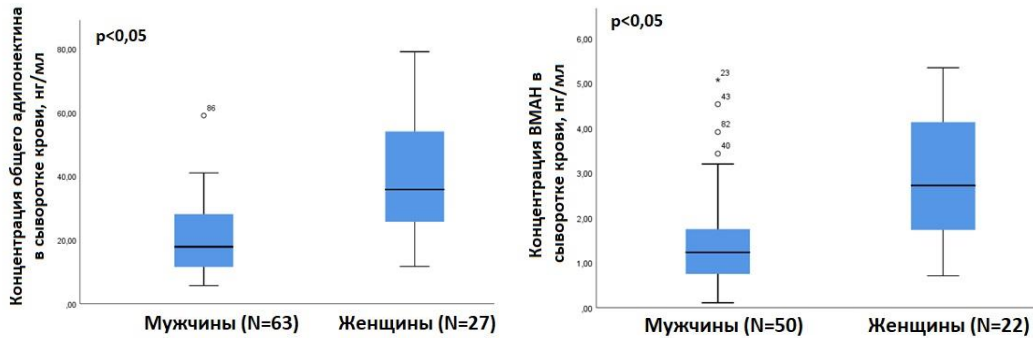


Рисунок 3. Концентрация общего и высокомолекулярного адипонектина в сыворотке крови в зависимости от пола.

Экспрессия гена *ADIPOQ* в жировой ткани при ожирении и ИБС

Относительный уровень мРНК гена *ADIPOQ* был измерен у пациентов в обеих выборках, а также в группах сравнения. У пациентов с ИБС и в соответствующей группе сравнения дополнительно было проведено определение уровня ВМАН в ЭЖТ и ПЖТ методом вестерн-блот. Относительный уровень мРНК гена *ADIPOQ* в ПЖТ был снижен у женщин с избыточной массой тела и ожирением по сравнению с группой сравнения ($p < 0,05$) (Рисунок 4).

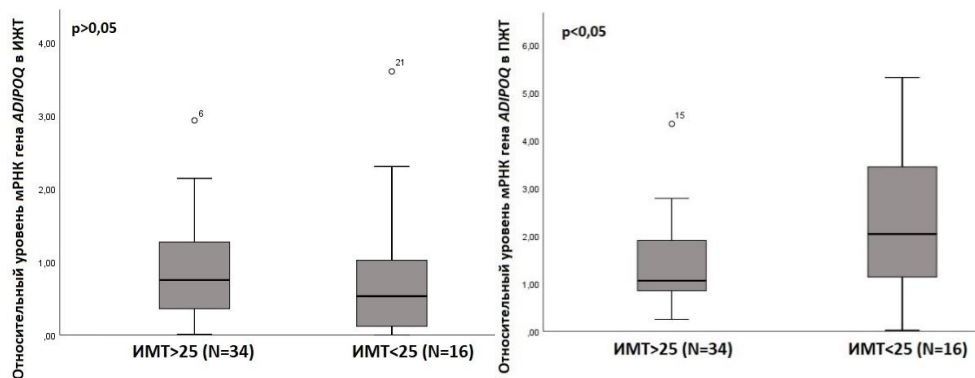


Рисунок 4. Относительный уровень мРНК гена *ADIPOQ* в ПЖТ и ИЖТ в исследуемых группах

Достоверных различий в экспрессии гена *ADIPOQ* в ИЖТ между исследуемыми группами найдено не было.

Наблюдалась отрицательная корреляция уровня мРНК гена *ADIPOQ* в ПЖТ с ИМТ и ОТ ($r=-0,323$, $p=0,025$ и $r=-0,464$, $p=0,001$ соответственно). Кроме того, у лиц с нормальной массой тела наблюдалась прямая корреляция между уровнем мРНК гена *ADIPOQ* в ПЖТ с уровнем общего адипонектина в сыворотке крови ($r=0,621$, $p=0,020$).

Уровень мРНК гена *ADIPOQ* в ПЖТ у пациентов с ИБС был ниже, чем в ПЖТ лиц группы сравнения ($p<0,05$) (Рисунок 5). Относительный уровень ВМАН в ПЖТ у пациентов с ИБС также был ниже, чем значение этого показателя у лиц из группы сравнения ($p<0,01$) (Рисунок 6). Не было выявлено статистически значимых различий в экспрессии гена *ADIPOQ* (Рисунок 5), а также в уровне ВМАН в ЭЖТ (Рисунок 6) у лиц с ИБС и группы сравнения. Можно предположить, что снижение экспрессии и содержания адипонектина в ПЖТ может быть ассоциировано с наличием ИБС вне зависимости от ожирения. Однако, продемонстрированное снижение экспрессии гена *ADIPOQ* в ПЖТ при избыточной массе тела может повышать риск развития ИБС. Нами впервые оценен уровень ВМАН в ПЖТ у лиц с ИБС и показана ассоциация ВМАН с заболеванием, что в соответствии с полученными данными о снижении ВМАН в плазме крови подтверждает антиатерогенную роль высокомолекулярного адипонектина.

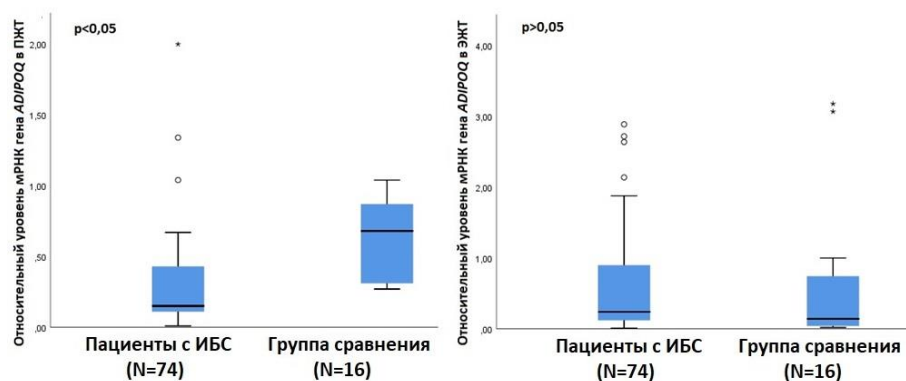


Рисунок 5. Относительный уровень мРНК гена *ADIPOQ* в ПЖТ и ЭЖТ в исследуемых группах

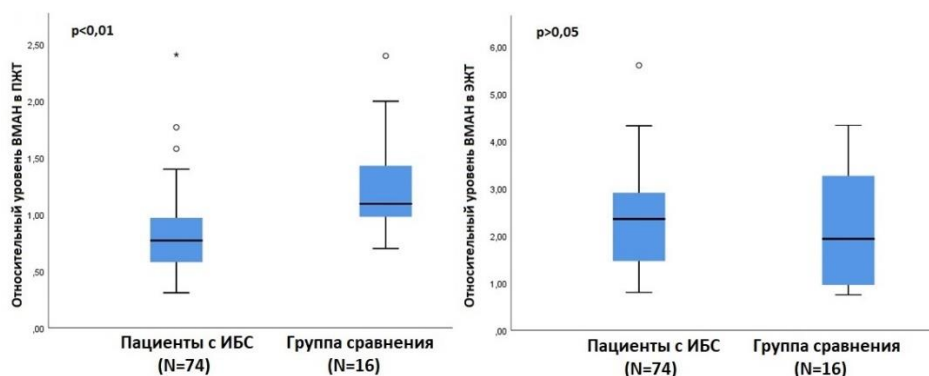


Рисунок 6. Относительный уровень ВМАН в ПЖТ (А) и ЭЖТ (Б) в исследуемых группах

При делении пациентов с ИБС на подгруппы, в зависимости от степени поражения коронарных артерий (окклюзия, количество пораженных артерий), а также в зависимости от наличия избыточного веса или ожирения, не было выявлено различий в концентрации общего адипонектина в сыворотке крови и уровня мРНК *ADIPOQ* и ВМАН в ЭЖТ и ПЖТ.

Мы предположили, что содержание мРНК *ADIPOQ* и ВМАН в ЭЖТ может зависеть от степени эпикардального ожирения. Так как прямой корреляционной связи толщины ЭЖТ с измеряемыми параметрами в нашем исследовании показано не было, а конкретные нормы толщины ЭЖТ не установлены, нами проведен сравнительный анализ содержания мРНК и ВМАН в ЭЖТ, на основании разделения на квартили по толщине ЭЖТ (1,9-4,4мм – 1 квартиль, 4,5-8,0мм – 2-3 квартили, 8,1-11,3мм – 4 квартиль). Было выявлено более низкое значение уровня ВМАН в ЭЖТ в подгруппе пациентов с толщиной ЭЖТ более 8 мм, чем у пациентов с толщиной ЭЖТ ≤ 8 мм (Рисунок 7).

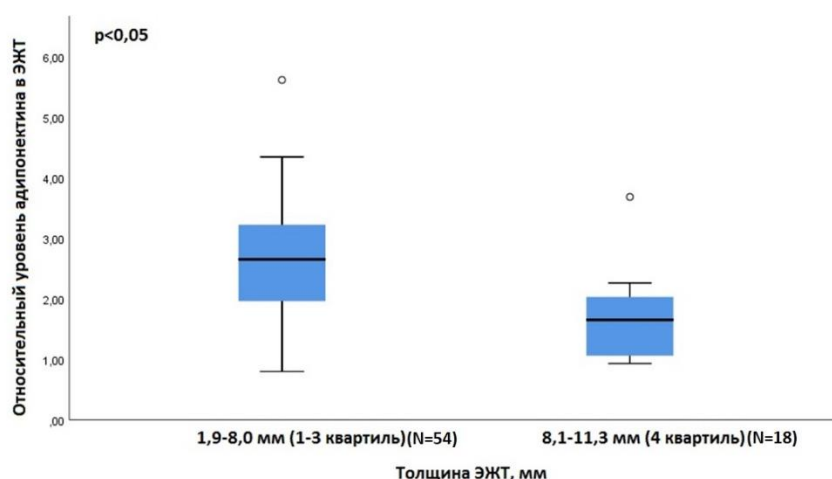


Рисунок 7. Относительный уровень ВМАН в ЭЖТ у обследованных пациентов в зависимости от толщины ЭЖТ

Таким образом, мы показали, что ожирение у женщин характеризуется снижением экспрессии гена *ADIPOQ* в ПЖТ. Также снижение уровня как мРНК гена *ADIPOQ*, так и уровня ВМАН в ПЖТ ассоциировано с развитием ИБС.

Влияние адипорона на экспрессию генов обратного транспорта холестерина в макрофагах человека

Учитывая показанную нами и другими авторами антиатерогенную роль адипонектина, актуальным становится изучение соединений, усиливающих функции адипонектина. В нашем исследовании, нами было выбрано низкомолекулярное

соединение – адипорон, агонист рецепторов адипонектина. Подобно адипонектину, адипорон проявлял антиатерогенные свойства как в культивируемых клетках, так и на моделях атеросклероза на мышцах с помощью механизмов, зависящих от рецепторов адипонектина (Zhang et al, 2015; Okada-Iwabu et al, 2013). Предполагают, что одним из механизмов антиатерогенного действия может являться предотвращение образования пенистых клеток в ходе участия адипонектина в регуляции ОТХ (Liang et al., 2015). В связи с чем, мы решили оценить влияние различных концентраций адипорона на экспрессию генов липидного обмена и воспаления *ABCA1*, *ABCG1*, *APOA1*, *LXRα* (*NR1H3*), *LXRβ* (*NR1H2*), *PPARG*, *ACAT1*, *IL6*, *TNFA*, *TLR4*, играющих важную роль в атерогенезе в клетках первичной культуры макрофагов человека.

Предварительно нами была проведена оценка выживаемости клеток линии ТНР-1 и первичной культуры макрофагов при концентрациях адипорона в диапазоне от 0 до 25 мкМ. Для первичной культуры макрофагов концентрация адипорона 20 мкМ была выбрана как максимальная для данного типа клеток. Воздействие тех же концентраций адипорона на клеточную линию ТНР-1, приводило к более значительному снижению выживаемости клеток, поэтому было принято решение работать с первичной культурой макрофагов.

Было показано повышение уровня мРНК генов *ABCA1* и *PPARG* в макрофагах при концентрациях 5, 10 мкМ ($p < 0,05$ и $p < 0,05$, соответственно) (Рисунок 8).

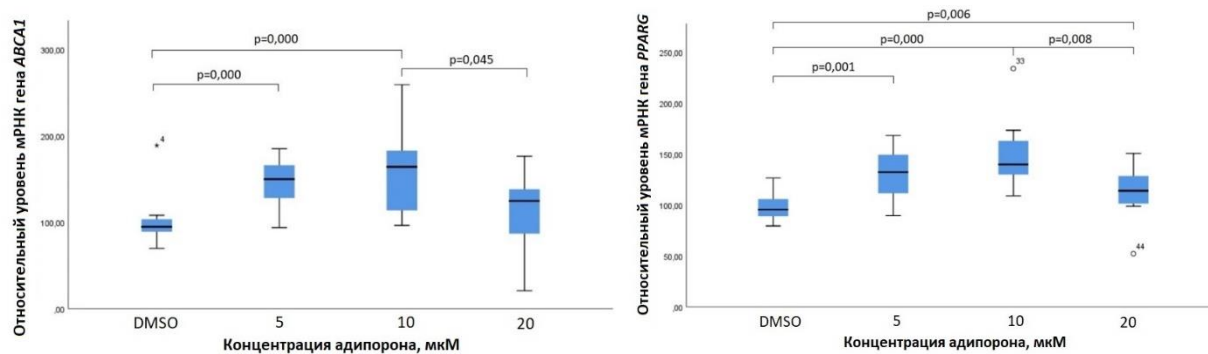


Рисунок 8. Относительный уровень мРНК генов *ABCA1* и *PPARG* в макрофагах после воздействия адипорона.

Не выявлено изменений относительного уровня мРНК генов *ABCG1*, *APOA1*, *LXRα* (*NR1H3*), *LXRβ* (*NR1H2*), *ACAT1*, *IL6*, *TNFA*, *TLR4* при воздействии адипорона.

Таким образом, исследованное нами воздействие адипорона на первичную культуру макрофагов показало его влияние на активацию экспрессии генов ОТХ, а именно увеличение экспрессии генов *PPARG* и *ABCA1* при концентрациях 5 и 10 мкМ. В то же время, был отмечен цитотоксический эффект более высоких концентраций адипорона, что может ограничивать возможность его использования в качестве антиатерогенного препарата.

Экспрессия гена оментина-1 в различных типах жировой ткани при ожирении и ИБС

Концентрация оментина-1 в сыворотке крови пациентов с ИБС и ожирением

Нами проведена оценка концентрации оментина-1 в сыворотке крови пациентов с ИБС и группе сравнения.

Концентрация оментина-1 в сыворотке крови была ниже в группе пациентов с ИБС, чем у обследованных группы сравнения ($p=0,001$) (Рисунок 9), при этом не было получено достоверно значимых различий в концентрации оментина-1 в сыворотке крови между подгруппами с ожирением и без ожирения ($p<0,05$) (Рисунок 10).

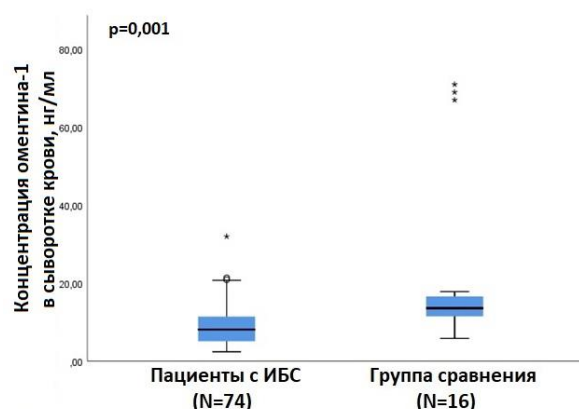


Рисунок 9. Концентрация оментина-1 в сыворотке крови в исследуемых группах

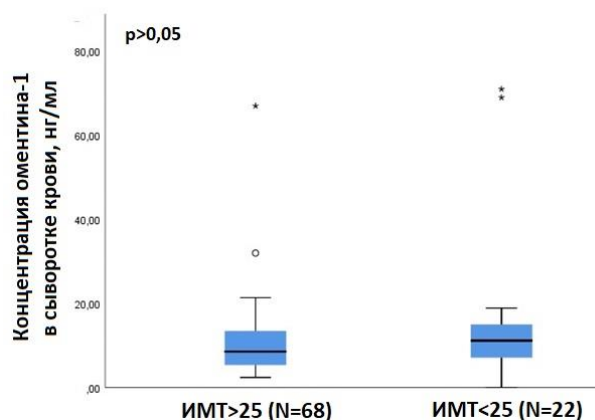


Рисунок 10. Концентрация оментина-1 в сыворотке крови в объединенной группе пациентов с ИБС и группы сравнения, разделенных по ИМТ

У женщин концентрация оментина-1 в сыворотке крови была выше, чем у мужчин ($p<0,05$) (Рисунок 11). Была выявлена корреляция между концентрацией оментина-1 в сыворотке крови и ИМТ, а также ОТ у обследованных, независимо от наличия ИБС ($r=-0,222$, $p<0,05$ и $r=-0,307$, $p<0,01$, соответственно).

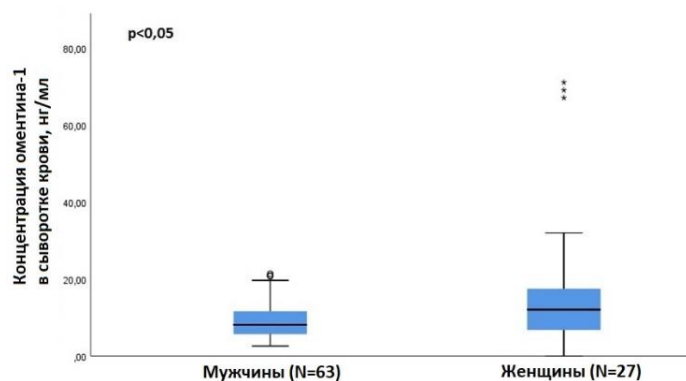


Рисунок 11. Концентрация оментина-1 в сыворотке крови у пациентов с ИБС и соответствующей группы сравнения в зависимости от пола

*Экспрессия гена *ITLN1* в жировой ткани при ожирении и ИБС*

Относительный уровень мРНК гена *ITLN1* был измерен методом ПЦР в режиме реального времени у пациентов в обеих выборках, а также в группах сравнения. У пациентов с ИБС и в соответствующей группе сравнения дополнительно было проведено определение уровня оментина-1 в ЭЖТ и ПЖТ методом вестерн-блот.

Не было получено различий в уровне мРНК гена *ITLN1* в ИЖТ и ПЖТ между группами женщин с избыточным весом и ожирением и нормальной массой тела ($p > 0,05$ и $p > 0,05$, соответственно).

Не было выявлено различий в уровне мРНК *ITLN1* и белка оментина-1 в ЭЖТ и ПЖТ у пациентов с ИБС и в группе сравнения. Однако, уровень белка оментина-1 в ЭЖТ был ниже у индивидуумов с избыточной массой тела, по сравнению с лицами с нормальным весом ($p < 0,05$) (Рисунок 12). Была выявлена отрицательная корреляция уровня мРНК гена *ITLN1* и белка оментина-1 в ЭЖТ с ИМТ ($r = -0,304$, $p = 0,027$, $r = -0,424$, $p = 0,035$, соответственно). Не было получено корреляции между уровнем мРНК гена *ITLN1* и белка оментина-1 в ЭЖТ и ПЖТ и концентрацией оментина-1 в сыворотке крови.

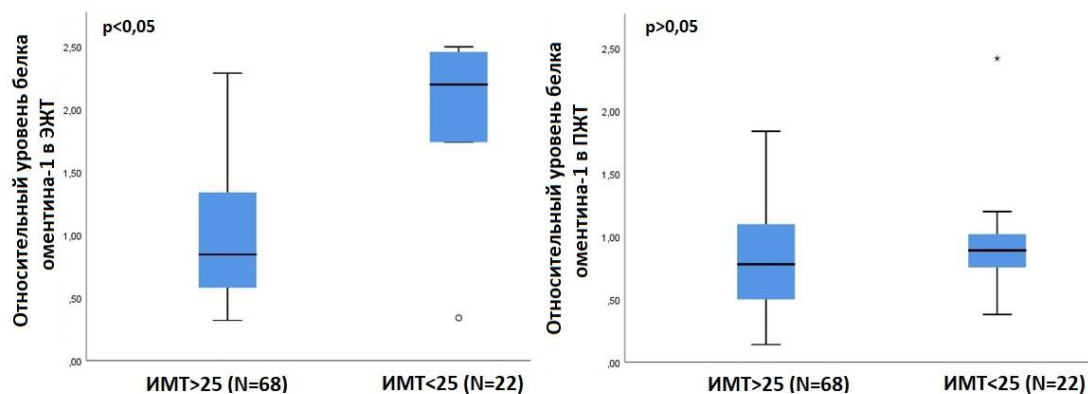


Рисунок 12. Относительный уровень белка оментина-1 в ЭЖТ и ПЖТ в исследуемых подгруппах.

Был выявлен более высокий уровень белка оментина-1 в ПЖТ у всех обследованных мужчин по сравнению с женщинами ($p < 0,05$) (Рисунок 13). Уровень мРНК гена *ITLN1* достоверно коррелировал с уровнем белка оментина-1 в ПЖТ ($r = 0,373$, $p < 0,05$).

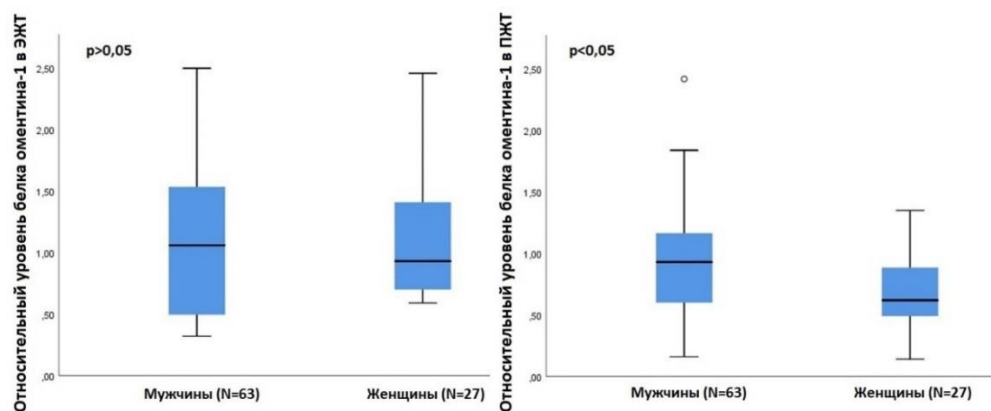


Рисунок 13. Относительный уровень белка оментина-1 в ЭЖТ и ПЖТ в объединенных группах в зависимости от пола: пациенты с ИБС и группа сравнения

Таким образом, наши данные предполагают более низкий вклад уровня экспрессии оментина-1 в исследованных типах жировой ткани в риск развития ИБС, чем адипонектина.

Экспрессия адипонектина и оментина-1 в различных типах жировой ткани

При сравнении различных типов ЖТ было показано, что относительный уровень мРНК гена *ADIPOQ* в ПЖТ был выше по сравнению с ИЖТ ($p < 0,001$), в то же время экспрессия гена *ADIPOQ* в ЭЖТ сопоставима с экспрессией в ПЖТ (Рисунок 14).

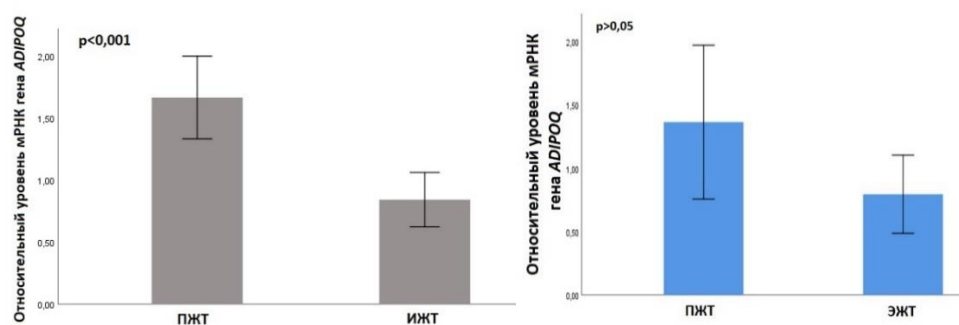


Рисунок 14. Относительный уровень мРНК гена *ADIPOQ* в различных типах жировой ткани

Тем не менее, стоит отметить, что относительный уровень ВМАН был выше в ЭЖТ, чем в ПЖТ ($p < 0,001$) (Рисунок 15).

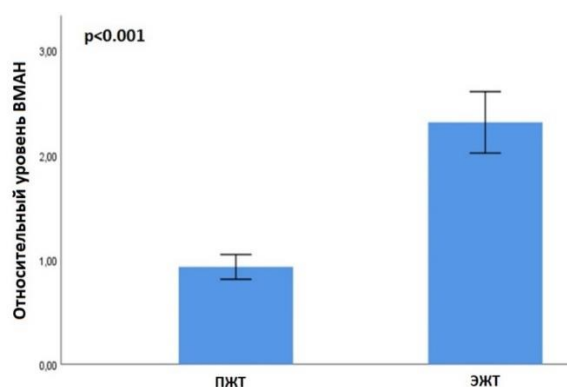


Рисунок 15. Относительный уровень ВМАН в различных типах жировой ткани
Уровень мРНК гена *ITLN1* в ПЖТ был ниже, чем в ЭЖТ и в ИЖТ (Рисунок 16) ($p=0,000$ и $p=0,000$, соответственно).

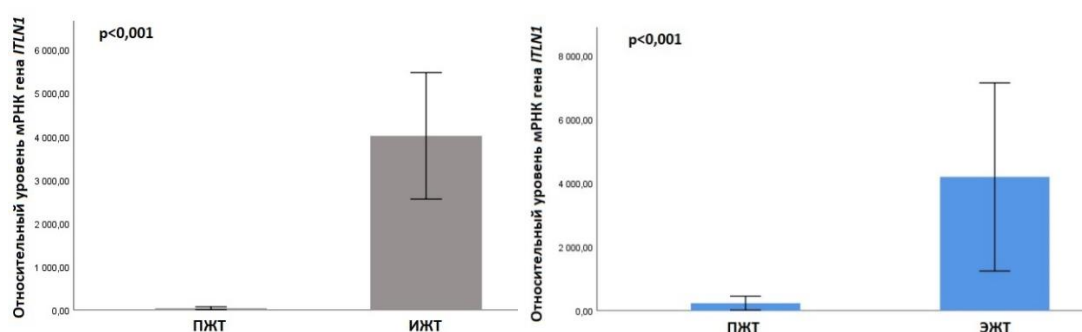


Рисунок 16. Относительный уровень мРНК гена *ITLN1* в различных типах жировой ткани

Относительный уровень белка оментина-1 был сопоставим в ЭЖТ и ПЖТ ($p>0,05$) (Рисунок 17).

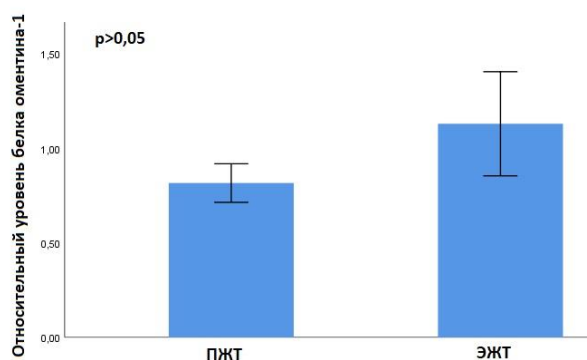


Рисунок 17. Относительный уровень белка оментина-1 в ЭЖТ и ПЖТ

Таким образом, оба типа ВЖТ, как ИЖТ, так и ЭЖТ более активны в отношении экспрессии гена *ITLN1* по сравнению с ПЖТ, которая, в свою очередь более активна в отношении экспрессии гена *ADIPOQ*, чем ИЖТ.

ВЫВОДЫ

1. Подкожная жировая ткань характеризуется более высоким уровнем экспрессии гена адипонектина, чем интраабдоминальная.
2. Снижение экспрессии гена адипонектина (мРНК, ВМАН) в подкожной жировой ткани ассоциировано с развитием ИБС.
3. Снижение экспрессии гена адипонектина (мРНК) у женщин ассоциировано с избыточной массой тела и ожирением (ИМТ>25).
4. Уровень ВМАН в ЭЖТ снижается при увеличении толщины ЭЖТ более 8 мм.
5. Эпикардальная и интраабдоминальная жировая ткань характеризуются увеличением уровня оментина-1, по сравнению с подкожной. При избыточной массе тела и ожирении наблюдается снижение экспрессии гена оментина-1 в эпикардальной жировой ткани.
6. Уровень экспрессии генов адипонектина и оментина -1 в жировой ткани не влияет на тяжесть течения ИБС, а именно, не ассоциирован с наличием окклюзий и количеством пораженных коронарных артерий.
7. Адипорон при концентрациях 5 и 10 мкМ активирует экспрессию генов-регуляторов липидного обмена *PPARG* и *ABCA1* в первичной культуре макрофагов человека. Высокие концентрация адипорона оказывали цитотоксический эффект в том числе и на макрофаги линии THP-1.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Разгильдина Н.Д., Бровин Д.Л., Побожева И.А., Пантелеева А.А., Мирошникова В.В., Беляева О.Д., Баранова Е.И., Пчелина С.Н. Экспрессия гена *ADIPOQ* в подкожной и висцеральной жировой ткани у женщин с различной степенью ожирения // Цитология. - 2018. - Т.6, №7. – С. 531-535. (ВАК, SCOPUS, РИНЦ). (Глава 3.2)
2. Побожева И.А., Разгильдина Н.Д., Полякова Е.А., Пантелеева А.А., Беляева О.Д., Нифонтов С.Е., Галкина О.В., Колодина Д.А., Беркович. О.А., Баранова Е.И., Пчелина С.Н., Мирошникова В.В. Экспрессия гена адипонектина в эпикардальной и подкожной жировой ткани при ишемической болезни сердца // Кардиология. – 2020. – Т.60, №3. – С.62-69. (ВАК, SCOPUS, РИНЦ). (Главы 3.2, 3.5, 3.6)
3. Побожева И.А., Пантелеева А.А., Полякова Е.А., Драчева К.В., Разгильдина Н.Д., Беляева О.Д., Беркович. О.А., Баранова Е.И., Пчелина С.Н., Мирошникова В.В. Оментин-1 подкожной жировой ткани при ишемической болезни сердца // Медицинская генетика. - 2020. - №11. – С. 21-30. (ВАК, РИНЦ). (Глава 3.4, 3.6)
4. Побожева И.А., Пантелеева А.А., Разгильдина Н.Д., Полякова Е.А., Драчева К.В., Беляева О.Д., Беркович О.А., Баранова Е.И., Пчелина С.Н., Мирошникова В.В. Адипокины жировой ткани в патогенезе ожирения и ишемической болезни сердца // Медицинская генетика. – 2020. – Т.19, №5. С. 60-61. (ВАК, РИНЦ). (Главы 3.2, 3.4, 3.5)

5. Miroshnikova V.V., Polyakova E.A., Pobozeva I.A., Panteleeva A.A., Razgildina N.D., Kolodina D.A., Belyaeva O.D., Berkovich O.A., Pchelina S.N., Baranova E.I. FABP4 and omentin-1 gene expression in epicardial adipose tissue from coronary artery disease patients // Genet. Mol. Biol. – 2021. - 44 (4). e20200441. (BAK, SCOPUS). (Глава 3.4)
6. Побожева И.А., Драчева К.В., Пчелина С.Н., Мирошникова В.В. Влияние адипорона на экспрессию генов липидного обмена в первичной культуре макрофагов человека // Молекулярная биология. – 2023. – Т.57, №4. – С. 623-631. (BAK, SCOPUS). (Глава 3.3)

Другие публикации о теме диссертации

7. Побожева И.А., Пантелеева А.А., Разгильдина Н.Д., Пчелина С.Н., Мирошникова В.В. Адипонектин эпикардальной жировой ткани в развитии ишемической болезни сердца, сборник «Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике», (под ред. член-корр. РАЕН Масленникова А.Б.), выпуск 27, Новосибирск, 2018, Академиздат, стр. 63-70. (Главы 3.2, 3.5)

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ИБС – ишемическая болезнь сердца
 ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания
 ВЖТ – висцеральная жировая ткань
 ИЖТ – интраабдоминальная жировая ткань
 ЭЖТ – эпикардальная жировая ткань
 ПЖТ – подкожная жировая ткань
 ЖТ – жировая ткань
 ВМАН – высокомолекулярный адипонектин
 ТГ - триглицериды
 ЛПНП – липопротеины низкой плотности
 ЛПОНП – липопротеины очень низкой плотности
 ЛПВП – липопротеины высокой плотности
 ХС – холестерин
 ХС-ЛПВП – холестерин в составе липопротеинов высокой плотности
 ХС-ЛПНП - холестерин в составе липопротеинов низкой плотности
 ХС-ЛПОНП - холестерин в составе липопротеинов очень низкой плотности
 ИМТ – индекс массы тела
 ОТ – окружность талии
 LXR - X-рецепторы печени
 PPAR - рецепторы семейства, активируемого пролифератором пероксисом ABCA1,
 ABCG1 - АТФ-связывающие кассетные транспортеры A1 и G1
 ApoA-I – аполипопротеин A-I
 TNF α – фактор некроза опухоли α
 ИЛ-6 – интерлейкин 6
 ОТХ – обратный транспорт холестерина
 TLR4 – толл-подобный рецептор 4
 АСАТ-1 - ацетил-КоА-ацилтрансфераза
 ПЦР – полимеразная цепная реакция
 ИФА – иммуноферментный анализ
 ЭХО - эхокардиография