

Національна академія наук України  
Інститут біохімії ім О.В.Палладіна

Міністерство освіти і науки України  
Київський національний університет імені Тараса Шевченка

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**Вілецька Юлія Миколаївна**

УДК 577.112.7:616

## **ДИСЕРТАЦІЯ**

**Експресія генів, які контролюють процеси проліферації, у  
підшкірній жировій тканині за умов ожиріння**

03.00.04 – біохімія  
Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело \_\_\_\_\_ Вілецька Ю.М.

Науковий керівник: **Мінченко Олександр Григорович**,  
член-кореспондент НАН України, доктор біологічних наук, професор

Київ - 2019

## АНОТАЦІЯ

*Вілецька Ю. М.* Експресія генів, які контролюють процеси проліферації, у підшкірній жировій тканині за умов ожиріння. – Рукопис.

Численні дані вказують на те, що за умов ожиріння спостерігається порушення різноманітних метаболічних процесів, у тому числі і процесів метаболізму глюкози, зокрема у підшкірній жировій тканині. Ожиріння являє собою серйозну патологію, що супроводжується різними ускладненнями, такими як дисліпідемія, атеросклероз, діабет 2 типу, і призводить до зниження тривалості і якості життя. Наявність надмірної ваги зумовлено численними чинниками: генетична схильність, малорухливий спосіб життя, зниження фізичної активності, соціально-економічні умови та інші. Проліферація жирової тканини супроводжується ангіогенезом, що є важливим фактором її росту і ініціюється гіпоксією на початковому етапі. У зв'язку з цим, велика увага приділяється вивченню механізмів росту жирової тканини та порушення метаболічних процесів на молекулярному рівні, що допоможе краще зрозуміти природу ожиріння, а також його ускладнень, зокрема порушення толерантності до глюкози. Це є важливим, оскільки кількість людей з ожирінням невідомо зростає, а розвиток асоційованих з ним метаболічних ускладнень є причиною передчасної смерті. Відомо, що процеси адипогенезу, ліполізу, а також ангіогенезу контролюються сіткою транскрипційних та інших регуляторних факторів. Дослідження змін в експресії генів, що контролюють процеси росту жирової тканини та розвиток обумовлених ожирінням метаболічних ускладнень, є важливим напрямом у цій області, оскільки може сприяти пошуку шляхів профілактики і лікування цих патологій. Відомо, що стрес ендоплазматичного ретикулула причетний до порушення метаболізму за умов ожиріння і розвитку резистентності до інсуліну, але детальні молекулярні механізми цих процесів залишаються до кінця не з'ясованими. А тому дослідження експресії ключових факторів регуляції процесів проліферації та ангіогенезу, особливо на клінічному матеріалі, може сприяти вивченню не з'ясованих ще питань.

Метою дисертаційної роботи було дослідити рівень експресії генів, що кодують ключові фактори ангиогенезу, проліферації та тромбоутворення, у підшкірній жировій тканині чоловіків за умов ожиріння та резистентності до інсуліну для розуміння їх ролі в розвитку ожиріння та його метаболічних ускладнень, а також виявлення можливої кореляції між змінами індексу маси тіла (BMI) та рівнем експресії цих генів. Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити 4 задачі: 1) Вивчити рівень експресії генів *VEGF-A*, *VEGF-A-189*, *PDGFC*, *FGF1*, *FGF2*, *FGFR2*, *FGFRL1*, *E2F8*, *HIF1A*, *EPAS1* та *CLEC3B* у підшкірній жировій тканині чоловіків за ожиріння з нормальною та порушеною толерантністю до глюкози; 2) Визначити рівень експресії генів протеїнфосфатаз *DUSP1*, *DUSP4*, *DUSP6*, *DUSP22* і *PTEN* у підшкірній жировій тканині чоловіків за ожиріння та резистентності до інсуліну; 3) Дослідити вплив ожиріння та резистентності до інсуліну на експресію генів *PLAU*, *PLAT*, *PLAUR* та *SERPINE1* у підшкірній жировій тканині чоловіків; 4) Вивчити рівень експресії генів *CTGF*, *MYLK*, *MEST*, *ITGAM*, *ITGB1*, *FAT1*, *PPDPF*, *SFRP4*, *CTHRC1* і *EGFL6* у підшкірній жировій тканині чоловіків за умов ожиріння з нормальною та порушеною толерантністю до глюкози; 5) Охарактеризувати рівень експресії генів *TLR2*, *TLR4*, *TNF*, *ADD3* та *ADM* у підшкірній жировій тканині чоловіків за умов ожиріння з нормальною та порушеною толерантністю до глюкози.

Дослідження проводилися на підшкірній жировій тканині, яку було взято шляхом біопсії у трьох груп чоловіків віком біля 45 років: без ознак ожиріння (контроль), з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози, а також з ожирінням та порушеною толерантністю до глюкози.

Вперше було встановлено, що за умов ожиріння у підшкірній жировій тканині чоловіків пригнічується експресія генів основних факторів ангиогенезу (*VEGF-A*, *VEGF-A-189*, *FGF-2* та *FGFRL1*), але збільшується рівень експресії генів *FGF1*, *FGFR2*, *E2F8*, *HIF1A*, *PLAT* і *CLEC3B*. Порушення толерантності до глюкози за умов ожиріння асоціюється з підвищеним рівнем експресії генів *VEGF-A*, *FGF2*, *FGF1*, *E2F8*, *PLAU*, *PLAUR* та *SERPINE1* і зниженим рівнем *CLEC3B* у підшкірній

жировій тканині порівняно з чоловіками, що мали ожиріння та нормальну толерантність до глюкози.

Показано, що рівень експресії генів протеїнфосфатаз *DUSP1*, *DUSP4*, *DUSP6* та *DUSP22*, а також генів *PTEN*, *TLR4* і *ADD3* у підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням та нормальною толерантністю до глюкози знижується порівняно з контролем, а розвиток резистентності до інсуліну супроводжується збільшенням рівня експресії генів протеїнфосфатаз. Встановлено також, що за умов ожиріння у підшкірній жировій тканині посилюється експресія генів *FAT1*, *PPDPF*, *CTGF*, *MEST*, *MYLK*, *TPD52*, *ITGB1*, *ITGAM*, *CTHRC1*, *SFRP4*, *EGFL6*, *TLR2*, *TNF* та *ADM*, причому розвиток резистентності до інсуліну супроводжується зниженням рівня експресії генів *CTGF*, *MYLK*, *TPD52*, *ITGB1*, *CTHRC1*, *EGFL6* і *ADM* та підвищенням – *TNF* і *SFRP4*. Надзвичайно важливим моментом роботи є дослідження мікроРНК, сайти зв'язування яких було виявлено в мРНК *EGFL6*, *SERPINE1*, *PTEN*, *ITGAM*, *CTHRC1*, *TLR2*, *PLAU* та *PLAUR* за допомогою біоінформатичного аналізу. Встановлено, що у підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози рівень експресії мікроРНК *miR-7*, *miR-21*, *miR-143*, *miR-145* та *miR-190b* знижується, а *miR-19a* підвищується. Оскільки зміни в експресії мікроРНК і мРНК є протилежно направлені, то це свідчить про причетність досліджених мікроРНК до регуляції рівня експресії таргетних мРНК на пост-транскрипційному рівні. Отримані в цій роботі результати вказують на важливу роль змін в експресії ключових регуляторних генів у розвитку ожиріння і його метаболічних ускладнень шляхом репрограмування геному.

**Ключові слова:** експресія мРНК, проліферація, ангиогенез, стрес ендоплазматичного ретикулума, ожиріння, резистентність до інсуліну, дорослі чоловіки.

## ANNOTATION

### ***Viletska Y. M. Expression of genes, which control proliferation processes, in subcutaneous adipose tissue in obesity. – Manuscript.***

Numerous data demonstrated that in obesity there are disturbances of various metabolic processes including glucose metabolism in subcutaneous adipose tissue. Obesity is a serious pathology that is accompanied by various complications, such as dyslipidemia, atherosclerosis, type 2 diabetes, and leads to a decrease in the duration and quality of life. The occurrence of overweight is due to numerous factors: genetic predisposition, sedentary lifestyle, reduced physical activity, and socio-economic conditions, as well as others. The proliferation of adipose tissue is accompanied by angiogenesis, which is an important factor in its growth and is initiated by hypoxia at the initial stage. In this regard, much attention is paid to the clarification of mechanisms of growth of adipose tissue and the disturbance of metabolic processes at the molecular level. This will help to better understand the nature of obesity, as well as its complications, in particular glucose intolerance. This is important because the number of people with obesity is constantly growing, and the development of metabolic complications associated with it is the causes of premature death. It is known that processes of adipogenesis, lipolysis, and also angiogenesis are controlled by a network of transcriptional and other regulatory factors. The study of changes in the expression of genes that control the growth of adipose tissue

and the development of obesity associated metabolic complications is an important trend in this area, as it may contribute to finding ways to prevent and treat these pathologies. It is known that the stress of the endoplasmic reticulum is associated with metabolic abnormalities in obese conditions and the development of insulin resistance, but the detailed molecular mechanisms of these processes remain unexplained. Therefore, the study of the expression of key factors in the regulation of proliferation and angiogenesis, especially on clinical material, may contribute to clarification of unclear issues.

The purpose of the dissertation was to investigate the level of gene expression encoding the key factors of angiogenesis, proliferation and thrombosis in subcutaneous adipose tissue of men with obesity and insulin resistance to clarify their role in the

development of obesity and its metabolic complications, as well as to identify possible correlation between changes in the expression of these genes and the body mass index (BMI). To achieve this goal, four tasks were to be solved: 1) To study the level of expression of the genes of the *VEGF-A*, *VEGF-A-189*, *PDGFC*, *FGF1*, *FGF2*, *FGFR2*, *FGFRL1*, *E2F8*, *HIF1A*, *EPAS1*, and *CLEC3B* genes in adipose adipose tissue in males with normal and impaired glucose tolerance; 2) Determine the level of *DUSP1*, *DUSP4*, *DUSP6*, *DUSP22*, and *PTEN* protein phosphate gene expressions in male subcutaneous fat with obesity and insulin resistance; 3) To investigate the effect of obesity and glucose intolerance on *PLAU*, *PLAT*, *PLAUR*, and *SERPINE1* gene expressions in male subcutaneous fat tissue; 4) Study the expression level of *CTGF*, *MYLK*, *MEST*, *ITGAM*, *ITGB1*, *FAT1*, *PPDPF*, *SFRP4*, *CTHRC1*, and *EGFL6* genes in male subcutaneous fat in obese conditions with normal and impaired glucose tolerance; 5) Characterize the expression level of *TLR2*, *TLR4*, *TNF*, *ADD3*, and *ADM* genes in male subcutaneous fat in obese conditions with normal and impaired glucose tolerance.

The studies were performed on subcutaneous fatty tissue, which was taken by biopsy in three groups of men aged close to 45 years: no signs of obesity (control), obesity and normal glucose tolerance, as well as obesity and impaired glucose tolerance.

For the first time, it was found that in adipose tissue of obese men the expression of genes encoding the major factors of angiogenesis (*VEGF-A*, *VEGF-A-189*, *FGF-2*, and *FGFRL1*) is suppressed, but the expression levels of *FGF1*, *FGFR2*, *E2F8*, *HIF1A*, *PLAT*, and *CLEC3B* genes is up-regulated. Furthermore, glucose intolerance in obesity is associated with increased levels of *VEGF-A*, *FGF2*, *FGF1*, *E2F8*, *PLAU*, *PLAUR*, and *SERPINE1* gene expressions, and down-regulation of *CLEC3B* gene in subcutaneous fat tissue compared with obese patients with normal glucose tolerance.

It has been shown that the level of *DUSP1*, *DUSP4*, *DUSP6*, *DUSP22*, and *PTEN*, *TLR4*, and *ADD3* gene expressions in subcutaneous adipose tissue of obese men with normal glucose tolerance is reduced compared with control, but the development of insulin resistance is accompanied by up-regulation of the level of protein phosphatase gene expressions. It has also been established that in obese adipose tissue the expression level of *FAT1*, *PPDPF*, *CTGF*, *MEST*, *MYLK*, *TPD52*, *ITGB1*, *ITGAM*, *CTHRC1*, *SFRP4*,

*EGFL6*, *TLR2*, *TNF*, and *ADM* genes is increased, but the development of insulin resistance is accompanied by down-regulation of the level *CTGF*, *MYLK*, *TPD52*, *ITGB1*, *CTHRC1*, *EGFL6*, and *ADM* gene expressions and up-regulation of *TNF* and *SFRP4* genes. Extremely important moment of this work is the study of miRNAs whose binding sites were detected in the *EGFL6*, *SERPINE1*, *PTEN*, *ITGAM*, *CTHRC1*, *TLR2*, *PLAU*, and *PLAUR* mRNAs using a bioinformatics assay. The level of miR-7, miR-21, miR-143, miR-145 and miR-190b miR-143, miR-145 and miR-190b expression in the subcutaneous adipose tissue of men with obesity and normal glucose tolerance is reduced but miR-19a is increased. Since changes in the expression of miRNA and mRNA are inversely directed, this indicates the involvement of the investigated miRNAs in regulating the level of target mRNA expression at the post-transcriptional level. The obtained results point to the important role of changes in the expression of key regulatory genes in the development of obesity and its metabolic complications through genome reprogramming.

**Key words:** mRNA expression, proliferation, angiogenesis, endoplasmic reticulum stress, obesity, insulin resistance, adult men.

### **Список публікацій здобувача за темою дисертації:**

1. Minchenko O.H., **Viletska Y. M.**, Minchenko D. O., Davydov V. V. Insulin resistance modifies the expression of proliferation related genes in obese adolescents and adult men. *Ukr Biochem J.* 2019, 91(3): 65-77. (**Scopus**).

2. Minchenko D. O., **Bashta Y. M.**, Ratushna O. O., Minchenko O. H. Glucose tolerance in obese men is associated with dysregulation of some angiogenesis-related gene expressions in subcutaneous adipose tissue. *Fiziol. Zh.*, 2016; 62(2): 12-23. (**Scopus**).

3. Minchenko O.H., **Bashta Y.M.**, Minchenko D.O., Kovalevska O.V., Kulinich A.O. Expression of genes, which participate in the control cell proliferation, in subcutaneous adipose tissue of the obese men with glucose intolerance. *Appl. Cell Biol.*, 2014, 3 (4), 120-128.

4. **Башта Ю.М.**, Герасименко Р.М, Глушак Н., Мінченко О.Г. Експресія факторів проліферації у підшкірній жировій тканині чоловіків за ожиріння. Вісник КНУ імені Тараса Шевченка. Проблеми регуляції фізіологічних функцій, 2014, 17: 21-25.

5. Мінченко Д.О., **Вілецька Ю.М.**, Давидов В.В., Мінченко О.Г. Експресія генів *TLR2*, *TLR4*, *TNFA* та *ADD3* у підлітків і дорослих чоловіків з ожирінням за умови різної чутливості до інсуліну. Сучасна педіатрія, 2017, 6(86): 147-152.

6. Ratushna O., Minchenko D., **Bashta Y.**, Herasymenko R., Minchenko O. The expression of *TIMP1*, *TIMP2*, *VCAN*, *SPARC*, *CLEC3B* and *E2F1* in subcutaneous adipose tissue of obese males and glucose intolerance. CellBio. 2013 2(2): 25-33.

7. **Bashta Y.M.**, Minchenko D.O., Bova D.O., Kovalevska O.V., Minchenko O.H. Expression of protein phosphatase *DUSP* genes in subcutaneous adipose tissue of obese men with normal and impairment glucose tolerance. Biol. Systems, 2014, 6 (1): 3-9.

8. **Viletska Y.M.**, Angiogenesis-related gene expressions in subcutaneous adipose tissue. Young scientists conference: Modern aspects of biochemistry and biotechnology – 2019. Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, 21-22 March, 2019, Kyiv. Ukr. Biochem. J., 2019, 91(2): 82.

9. **Башта Ю.**, Мінченко Д. Експресія генів *PTEN* та родини протеїнфосфатаз *DUSP* у підшкірній жировій тканині чоловіків за ожиріння з нормальною і порушеною толерантністю до глюкози. Молодь і поступ біології. XI Міжнародна наукова конф. студ. і аспір. Збірник тез. Львів, Сполом, 2015: 53-54.

10. Ratushna O.O., Minchenko D.O., **Bashta Y.M.**, Minchenko O.H. Expression of anti-proliferative genes in subcutaneous adipose tissue of obese males and glucose intolerance. FEBS EMBO Conference: 30 August-4 September, Paris, France, 2014: FEBS J. – 281, Suppl. 1: 563.

11. Ратушна О.О., **Башта Ю.М.**, Мінченко О.Г. Збільшення експресії факторів росту у підшкірній жировій тканині у чоловіків з ожирінням і порушенням толерантності до глюкози. Матеріали XI Укр. біохім. конгресу, 6-10 жовтня 2014, Київ. Ukr. Biochem. J., 2014; 86, N 5 (Suppl.1), 197.



12. **Башта Ю.М.**, Мінченко О.Г. Експресія факторів проліферації у підшкірній жировій тканині чоловіків за ожиріння. X Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів „Молодь і поступ біології”, Збірник тез. Львів, 8-11 квітня 2014 року, Львів, СПОЛОМ, 2014, с. 205-206.

13. **Bashta Y.M.**, Minchenko O.H. Expression of growth factors in subcutaneous fat tissue in men with obesity and glucose intolerance. XII International Scientific Conference of Students and Young Scientists. Shevchenkivska Vesna: Life Sciences, March 25-28, Kyiv 2014, 15-16.

14. Мінченко О.Г., Кривдюк І.В., Харькова А.П., **Башта Ю.М.**, Мінченко Д.О. Роль стресу ендоплазматичного ретикулума в нормі та за патологічних станів. 2-га Міжнародна наукова конференція “Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології, Дніпропетровськ, 24-25 вересня 2013, Дніпропетровськ, 2013, 43.

15. Мінченко О.Г., **Башта Ю.М.**, Мінченко Д.О., Компанієць Д.О. Молекулярні механізми розвитку ожиріння та його ускладнень. Актуальні питання біології, екології, медицини та фармакології. Дніпропетровськ, 26-27 вересня 2013, Харків, НВФ Екограф, 2013, 72-73.

16. Ratuszna O., Minchenko D., **Bashta Y.**, Minchenko O. Expression of HK2, IRS1, PFKFB and circadian genes in subcutaneous adipose tissue in obesity, glucose intolerance and type 2 diabetes. The 7th International Conference of Young Naturalists. From Biotechnology to Environmental Protection. The interdisciplinary meeting of young naturalists. November 8-10, 2012, Zielona Gora, Poland, 2012, P. 101-102.

## ЗМІСТ

<b>ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ .....</b>	<b>12</b>
<b>ВСТУП.....</b>	<b>15</b>
<b>РОЗДІЛ 1.....</b>	<b>22</b>
<b>ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ .....</b>	<b>22</b>
1.1. Ожиріння як глобальна проблема людства .....	22
1.2. Ключова роль факторів, які контролюють процеси ангиогенезу. ....	29
1.3. Вплив ожиріння на регуляцію фібринолітичної системи .....	32
1.4. Молекулярні механізми регуляції метаболізму сигнальними шляхами .....	34
1.5. Значення факторів росту в процесі диференціювання адипоцитів.....	39
<b>РОЗДІЛ 2.....</b>	<b>46</b>
<b>МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....</b>	<b>46</b>
2.1. Матеріали та умови проведення експерименту .....	46
2.2. Виділення РНК .....	48
2.3. Синтез комплементарних ДНК методом зворотної транскрипції мРНК та ампліфікація комплементарних ДНК методом полімеразної ланцюгової реакції ..	49
2.4. Зворотна транскрипція мікроРНК.....	50
2.5. Вивчення експресії мРНК методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі .....	51
2.6. Електрофорез ампліфікованих фрагментів ДНК в агарозному гелі. ....	58
2.7. Біоінформаційний аналіз сайтів зв'язування мікроРНК з мРНК.....	59
2.8. Статистична обробка результатів.....	59
<b>РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ .....</b>	<b>61</b>
3.1. Експресія генів, що кодують ангиогенні фактори, у підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням і нормальною та порушеною толерантністю до глюкози..	61

3.2. Експресія генів, що кодують протеїнфосфатази родини DUSP, у підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням і нормальною та порушеною толерантністю до глюкози.....	79
3.3. Експресія генів, що кодують фактори росту, причетні до контролю проліферації клітин, у підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням і нормальною та порушеною толерантністю до глюкози. ....	83
3.4. Експресія мікроРНК у підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози.....	101
<b>РОЗДІЛ4.....</b>	<b>106</b>
<b>ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ .....</b>	<b>106</b>
4.1. Вплив ожиріння на експресію генів, які контролюють процеси ангіогенезу у підшкірній жировій тканині.....	106
4.2. Вплив ожиріння на експресію генів, які кодують ключові фактори сигнальних шляхів .....	112
4.3. Експресія генів факторів росту, які контролюють процеси проліферації у підшкірній жировій тканині.....	115
<b>Висновки .....</b>	<b>122</b>
<b>Список використаних літературних джерел .....</b>	<b>124</b>
<b>Додаток 1.....</b>	<b>144</b>

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ADD3 – adducin3 (Аддуцин 3);

Adipo Q – adiponectin (адипонектин);

ATGL/PNPLA2 - patatin like phospholipase domain containing 2 (адипоцитарна ліпаза тригліцеридів);

ATF4 – activating transcription factor 4, (активуючий транскрипційний фактор 4);

ATF6 – activating transcription factor 6, (активуючий транскрипційний фактор 6);

BiP/GRP78/HSPA5 – binding immunoglobulin protein/ 78 kDa glucose-regulated protein/ Heat shock protein family A (Hsp70) member 5 (протеїн, що зв'язує імуноглобулін/ 78 кДа протеїн, що регулюється глюкозою/ 5-ий протеїн теплового шоку родини A);

CTGF/CCN2 - connective tissue growth factor/cellular communication network factor 2 (фактор росту сполучної тканини);

DUSP1/МКР1 - dual specificity phosphatase 1/mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 (фосфатаза 1 протеїн-кінази, що активується мітогеном);

DUSP4/МКР2 - dual specificity phosphatase 2/mitogen-activated protein kinase phosphatase 2 (фосфатаза 2 протеїн-кінази, що активується мітогеном);

DUSP6/МКР3 - dual specificity phosphatase 6/mitogen-activated protein kinase phosphatase 3 (фосфатаза 3 протеїн-кінази, що активується мітогеном);

DUSP22/МКРХ - dual specificity phosphatase 22/mitogen-activated protein kinase phosphatase X (фосфатаза X протеїн-кінази, що активується мітогеном);

HIF1A – hypoxia-inducible factor-1A (фактор-1A, що індукується за гіпоксії);

HSL – LIPE lipase E, hormone sensitive type (чутлива до гормонів ліпаза);

IRS – insulin receptor substrate (субстрат рецептора інсуліну);

IKK $\beta$ /ІКВКВ - inhibitor of nuclear factor kappa B kinase subunit beta;

JNK - c-Jun N-terminal kinase 1 (mitogen-activated protein kinase 8 MAPK8);

EPAS1 – endothelial PAS domain protein 1 (HIF2A);

FFAs – вільні жирні кислоти;

FGF1 – fibroblast growth factor-1 (фактор росту фібробластів 1);

FGF2 – fibroblast growth factor-2 (фактор росту фібробластів 2);

FGFR2 – fibroblast growth factor receptor-2 (рецептор-2 фактора росту фібробластів);

FGFRL1 – fibroblast growth factor receptor-like 1 (подібний до рецептора фактора росту фібробластів 1);

E2F8 – транскрипційний фактор 8 групи E2F

eIF2 $\alpha$  – eukaryotic translation initiation factor 2 $\alpha$  ( $\alpha$ -субодиниця фактора ініціації трансляції 2);

ER – endoplasmic reticulum (ендоплазматичний ретикулум);

ERN1/IRE1 – endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1/ inositol-requiring enzyme 1 (сигнальний шлях від ендоплазматичного ретикулума до ядра 1/ ензим, залежний від інозитулу 1);

ERK – extracellular signal-regulated kinase (позаклітинна кінза, що регулюється сигналами)

MAPK – mitogen-activated protein kinase (протеїнкіназа, що активується мітогеном);

MEST – mesoderm specific transcript (транскрипт, специфічний для мезодерми);

MMP – матриксна металопротеїназа;

PLC – фосфоліпаза C;

NF $\kappa$ B – ядерний фактор капа легкого ланцюга B;

PERK – PRK-like endoplasmic reticulum kinase (PRK-подібна кінза ендоплазматичного ретикулума);

PI3K – phosphoinositide 3-kinase (фосфоінозитид 3-кінза);

PTEN – phosphatase and tensin homolog (гомолог фосфатази і тензину);

PKA – протеїнкіназа A;

PKB – протеїнкіназа B;

PKC – протеїнкіназа C;

tPa – тканинний активатор плазміногену;

TNF/TNF- $\alpha$  – Tumor Necrosis Factor (фактор некрозу пухлин);

TLR2 – Toll like receptor 2;

TLR4 – Toll like receptor 4;

UPR – unfolded protein response (відповідь на незгорнуті протеїни);

uPa/PLAU - Urokinase-Type Plasminogen Activator/Plasminogen Activator, Urokinase (активатор плазміногену урокіназного типу);

VEGFA – vascular endothelial growth factor A (ендотеліальний фактор росту судин A);

VEGFA-189 – vascular endothelial growth factor A-189 (сплайс-варіант 189 ендотеліального фактора росту судин A)

XBP1 – X-box binding protein 1 (протеїн 1, що зв'язується з X-боксом);

АФК – активні форми кисню.

## ВСТУП

**Актуальність теми.** Розуміння молекулярних механізмів регуляції різних біохімічних процесів як у окремих клітинах, так і цілого організму є надзвичайно важливим напрямком сьогодення. Ріст жирової тканини обумовлений численними факторами: збільшеним споживанням їжі, малорухливим способом життя, не якісною їжею, інтоксикацією організму і призводять до збільшення маси тіла за рахунок накопичення жирової тканини та багатогранних порушень метаболізму. Ожиріння є великою проблемою, що може призвести до зниження тривалості життя, тому що супроводжується такими ускладненнями як резистентність до інсуліну, діабет 2 типу, дисліпідемія, атеросклероз, злоякісні новоутворення. Жирова тканина є не тільки органом зберігання енергетичних субстратів, але й найбільшою ендокринною залозою, яка секретує різні гормони і взаємодіє майже з усіма органами нашого організму. За останні п'ятдесят років зміни умов життя сприяли глобальній пандемії ожиріння, яке супроводжується метаболічними ускладненнями і вимагає тривалого лікування [1]. Саме тому ця робота присвячена дослідженню важливих регуляторних факторів, які контролюють процеси адипогенезу, ангиогенезу та чутливість до інсуліну, для виявлення молекулярних механізмів розвитку ожиріння і його метаболічних ускладнень, а також принципово нових пошуку шляхів профілактики та лікування.

Стрес, спричинений збільшенням жирової тканини і порушенням метаболічних процесів в організмі, помітно відбивається на функціональному стані ендоплазматичного ретикулума (ЕР). Ця дисфункція ЕР призводить до порушення пострасляційної модифікації протеїнів, підвищеного вивільнення медіаторів запалення, активації JNK, IKK $\beta$ , тим самим сприяючи розвитку резистентності до інсуліну [2].

Ангиогенез є важливим компенсаторним механізмом розростання жирової тканини. Під час розвитку ожиріння ангиогенна активність є збільшеною, щоб забезпечити кровопостачання до збільшеної кількості адипоцитів. Як тільки вага тіла людини з ожирінням досягає стабільного рівня, швидкість росту судин жирової

тканини знижується, що може пояснюватися зниженим рівнем таких потужних ангіогенних факторів, як VEGF, який є головним ендотеліальним фактором росту судин і індукується гіпоксією на початковому етапі ожиріння, а також факторами FGF1 (фактором росту фібробластів 1) та PDGF (тромбоцитарним фактором росту), причому активність останнього може залежати й від активності VEGF [3]. Ожиріння також пов'язане із підвищеним ризиком серцево-судинних захворювань і характеризується системним запаленням та протромботичним станом. Зв'язок між ожирінням, інгібуванням фібринолізу і підвищеним рівнем PAI-1 (SERPINE1) розглядається як центральний компонент для цього протромботичного стану. Збільшений рівень PAI-1 може бути пов'язаним з високим рівнем лептину за ожиріння, який залучений до активації та агрегації тромбоцитів, а також внутрішньосудинного тромбозу [4].

Жирова тканина є чутливою до інсуліну, який стимулює зберігання тригліцеридів множинними механізмами, включаючи стимулювання диференціювання преадипоцитів до зрілих адипоцитів, збільшення поглинання глюкози і жирних кислот та інгібування ліполізу. Метаболічні ефекти інсуліну опосередковуються переважно активацією двох основних сигнальних шляхів: РІЗК/АКТ і MAPK [5]. Шлях MAPK направлений на стимулювання мітогенних та ростових ефектів інсуліну, а РІЗК-АКТ / РКВ є важливим для більшості метаболічних дій інсуліну. MAPKs регулюють метаболічний гомеостаз шляхом фосфорилювання факторів транскрипції, які контролюють такі процеси, як адипогенез, сигналювання інсуліну, поглинання глюкози, метаболізм жирних кислот і ліпогенез [6]. DUSP фосфатази є негативними регуляторами MAPK кіназ та контролюють клітинну диференціацію та проліферацію [7]. Члени МКР родини відіграють різну роль у метаболізмі. Показано, що щури, позбавлені гена МКР-1 (DUSP-1), були стійкими до індукованого дієтою ожиріння внаслідок збільшення витрат енергії. Було виявлено, що МКР-3 (DUSP-6) сприяє глюконеогенезу печінки шляхом дефосфорилювання транскрипційного фактора FOXO1, а МКР-2 (DUSP-4) може інгібувати експресію МКР-1 через ERK сигнальний шлях, і тим самим посилювати експресію запальних цитокінів [8].



Доведено, що при ожирінні гіпертрофовані адипоцити вивільняють насичені жирні кислоти, такі як лауринова, пальмітинова і стеаринова, які індукують запальні відповіді через TLR4 та TLR2 сигнальні шляхи, збільшуючи синтез запальних цитокінів, таких як TNF- $\alpha$ . Крім того, серинові залишки IRS фосфорилуються MAPKs шляхом активації сигналізації TLR4 і порушують сигналювання інсуліну, внаслідок чого розвивається резистентність до інсуліну [9].

Саме дослідження особливостей експресії ключових генів, які контролюють процеси проліферації та ангиогенезу, є актуальним напрямком біохімічних досліджень для з'ясування їх участі у регуляції процесів розвитку метаболічних захворювань за ожиріння, в тому числі резистентності до інсуліну. Це може бути важливим підґрунтям для виявлення генів-мішеней і розробки нових підходів для лікування та профілактики метаболічних захворювань.

**Мета і завдання роботи.** Мета дисертаційної роботи – дослідження рівня експресії генів, що кодують ключові фактори ангиогенезу, проліферації та тромбоутворення, у підшкірній жировій тканині чоловіків за умов ожиріння та резистентності до інсуліну для розуміння їх ролі в розвитку ожиріння та його метаболічних ускладнень, а також виявлення можливої кореляції між змінами індексу маси тіла (BMI) та рівнем експресії цих генів.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити наступні задачі:

1. Вивчити рівень експресії генів *VEGF-A*, *VEGF-A-189*, *PDGFC*, *FGF1*, *FGF2*, *FGFR2*, *FGFRL1*, *E2F8*, *HIF1A*, *EPAS1* та *CLEC3B* у підшкірній жировій тканині чоловіків за ожиріння з нормальною та порушеною толерантністю до глюкози.

2. Визначити рівень експресії генів протеїнфосфатаз *DUSP1*, *DUSP4*, *DUSP6*, *DUSP22* і *PTEN* у підшкірній жировій тканині чоловіків за ожиріння та резистентності до інсуліну.

3. Дослідити вплив ожиріння та резистентності до інсуліну на експресію генів *PLAU*, *PLAT*, *PLAUR* та *SERPINE1* у підшкірній жировій тканині чоловіків.

4. Вивчити рівень експресії *CTGF*, *MYLK*, *MEST*, *ITGAM*, *ITGB1*, *FAT1*, *PPDPF*, *SFRP4*, *CTHRC1* і *EGFL6* у підшкірній жировій тканині чоловіків за умов ожиріння з нормальною та порушеною толерантністю до глюкози.

5. Охарактеризувати рівень експресії генів *TLR2*, *TLR4*, *TNF*, *ADD3* та *ADM* у підшкірній жировій тканині чоловіків за умов ожиріння та резистентності до інсуліну.

**Об'єкт дослідження:** експресія генів *VEGF*, *VEGF-A-189*, *PDGFC*, *FGF1*, *FGF2*, *FGFR2*, *FGFRL1*, *E2F8*, *HIF1A*, *EPAS1*, *CTGF*, *MYLK*, *MEST*, *PLAU*, *PLAT*, *PLAUR*, *SERPINE1*, *CLEC3B*, *TPD52*, *ITGB1*, *ITGAM*, *DUSP1*, *DUSP4*, *DUSP6*, *DUSP22*, *PTEN*, *FAT1*, *PPDPF*, *SFRP4*, *CTHRC1*, *EGFL6*, *TLR2*, *TLR4*, *TNF*, *ADD3*, *BiP* та *ADM* людини.

**Предмет дослідження:** рівень експресії генів, які контролюють процеси проліферації та ангиогенезу, а також ключових транскрипційних факторів, протеїнфосфатаз і ростових факторів у нормі, за ожиріння та за наявності резистентності до інсуліну.

**Методи дослідження:** у роботі використано методи синтезу комплементарних ДНК, полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі для визначення рівня експресії генів ключових ензимів, транскрипційних та регуляторних факторів, виділення РНК із жирової тканини, спектрофотометричні методи визначення кількості РНК та їх спектральних характеристик, а також комп'ютерний аналіз результатів, отриманих за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції. Отримані в процесі виконання роботи експериментальні дані обраховано методами статистичної обробки результатів та кореляційного аналізу в програмі Excel та Origin 7.0. Для порівняння двох вибірок спочатку перевіряли їх на нормальність розподілу за W-критерієм Шапіро-Вілка. Показник статистичної достовірності відмінностей  $p$  обчислювали за критерієм Стьюдента, використовуючи двовибірковий t-тест для середнього Гланц С. *Медицина-Биологическая Статистика. Пер. с Англ.*; 1999. Різницю між двома середніми величинами вважали достовірною при значенні  $p \leq 0.05$ . Для кореляційного аналізу використовували тест Пірсона.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Вперше було показано, що за умов ожиріння у підшкірній жировій тканині чоловіків пригнічується експресія генів основних факторів ангиогенезу (*VEGF-A*, *VEGF-A-189*, *PDGFC*, *FGF2* та *FGFRL1*), але збільшується рівень експресії генів *FGF1*, *FGFR2*, *E2F8*, *HIF1A* і *PLAT*. Порушення толерантності до глюкози за умов ожиріння асоціюється з підвищеним рівнем експресії генів *VEGF-A*, *FGF2*, *FGF1*, *E2F8*, *PLAU*, *PLAUR* та *SERPINE1* і зниженим рівнем експресії гена *CLEC3B* у підшкірній жировій тканині чоловіків порівняно з чоловіками, що мали ожиріння та нормальну толерантність до глюкози.

Показано, що у підшкірній жировій тканині пацієнтів з ожирінням знижується рівень експресії генів *DUSP1*, *DUSP4*, *DUSP6*, *DUSP22*, *ADD3* та *PTEN* порівняно з контрольною групою, а розвиток резистентності до інсуліну підвищує рівень експресії генів усіх протеїнфосфатаз родини DUSP, але знижує PTEN при порівнянні з особами, які мали ожиріння і нормальну толерантність до глюкози. Встановлено, що ожиріння супроводжується підвищеним рівнем експресії генів *CTGF*, *MYLK*, *MEST*, *TPD52*, *ITGB1* та *ITGAM* у жировій тканині чоловіків порівняно з контрольною групою, а порушення толерантності до глюкози за умов ожиріння знижує рівень експресії цих генів у порівнянні з пацієнтами, які мали ожиріння і нормальну толерантність до глюкози, за винятком гена *ITGAM*.

Показано, що у підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози підвищується рівень експресії генів *FAT1*, *PPDPF*, *SFRP4*, *EGFL6*, *CTHRC1*, *ADM*, *TLR2* та *TNF* порівняно з контролем, а порушення толерантності до глюкози впливає лише на рівень експресії *CTHRC1*, *ADM*, *SFRP4*, *TNF* і *EGFL6*: знижує *EGFL6*, *ADM* і підвищує *SFRP4* та *TNF*. У мРНК *EGFL6*, *SERPINE1*, *PTEN*, *ITGAM*, *CTHRC1*, *TLR2*, *PLAU* та *PLAUR* за допомогою біоінформатичного аналізу виявлено сайти зв'язування мікроРНК miR-7b, miR-19a, miR-21, miR-143, miR-145 та miR-190b і встановлено, що у підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози знижується рівень експресії мікроРНК miR-7b, miR-21, miR-143, miR-145 та miR-190b, а miR-19a – підвищується. Отримані результати вказують на важливу роль змін в експресії

ключових регуляторних генів у розвитку ожиріння і його метаболічних ускладнень шляхом репрограмування геному.

**Практичне значення роботи** полягає у з'ясуванні можливих молекулярних механізмів розвитку ожиріння та його ускладнень, зокрема резистентності до інсуліну та порушення ангиогенезу, які вказують на зв'язок ожиріння та резистентності до інсуліну із сигнальними системами клітини, які контролюють процеси проліферації і виживання клітини, що може бути необхідним для розробки нових підходів до профілактики та лікування ожиріння, а також резистентності до інсуліну.

**Особистий внесок здобувача.** Дисертаційна робота – завершене дослідження, яке виконане і сплановане автором протягом 2013-2019 р.р. Дисертантом було самостійно здійснено аналіз даних літератури за темою роботи, проведено експериментальні дослідження із вивчення експресії різних генів, які кодують ключові фактори ангиогенезу, проліферації, ензимів, що контролюють метаболізм, у дорослих чоловіків з ожирінням і нормальною та порушеною толерантністю до глюкози, а також обробку отриманих результатів. Окремі дослідження по визначенню експресії частини генів проводилися за участі наукових співробітників Мінченка Д.О. та провідного інженера Рябовол О.О., вибір тематики досліджень, розробка методології, аналіз та обговорення результатів за участі наукового керівника, д.б.н., проф., чл.-кор. НАН України Мінченка О.Г.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційну роботу виконано протягом 2013-2019 рр. у відділі молекулярної біології Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України у рамках проведення планових досліджень за бюджетними темами: «Молекулярні основи взаємодії генів в механізмах регуляції їх експресії», № ДР 0111U002234 (2011–2015 рр.), «Механізми регуляції внутрішньоклітинних сигнальних мереж, міжклітинних та міжмолекулярних взаємодій», № ДР 0112U002624 (2012–2016 рр.) та «Роль стресу ендоплазматичного ретикулума у функціональній перебудові геному і пошук генів-мішеней для пригнічення росту гліом», № ДР 0116U001027 (2016–2020 рр.), “Lipid droplets as dynamic organelles of fat deposition and release: translational research towards human

disease” по 7th Framework Program of European Commission project “LipidomicNet” (№ 202272; 2007-2012 pp.), а також на кафедрі біохімії Навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка МОН України в рамках науково-дослідної теми «Механізми реалізації адаптаційно-компенсаторних реакцій організму за умов розвитку різних патологій» № ДР 0111U004648 (2011-2015 pp.).

**Апробація результатів дисертації.** Результати досліджень було представлено на українських і міжнародних конференціях: The 7th International Conference of Young Naturalists. From Biotechnology to Environmental Protection. The interdisciplinary meeting of young naturalists. Poland, 2012; Молекулярні механізми розвитку ожиріння та його ускладнень. Актуальні питання біології, екології, медицини та фармакології. Дніпропетровськ, Харків, 2013; 2-га Міжнародна наукова конференція “Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології, Дніпропетровськ, 2013; XII International Scientific Conference of Students and Young Scientists. Shevchenkivska Vesna: Life Sciences, Kyiv 2014; X Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів „Молодь і поступ біології”, Львів, 2014; FEBS EMBO Conference: 30 August-4 September, Paris, France, 2014; XI Укр. біохім. конгресу, 6-10 жовтня 2014, Київ; XI Міжнародна наукова конф. студ. і аспір. Збірник тез. Львів, Сполон, 2015; Конференція-конкурс молодих учених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2019», Київ, 2019.

**Публікації.** За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 7 робіт у іноземних та українських фахових наукових виданнях, що входять до переліку, затвердженого ДАК України, причому 2 із них входять до бази Scopus, і 9 тез доповідей у матеріалах міжнародних та українських наукових форумів, конгресів і конференцій.

**Обсяг і структура дисертації.** Дисертаційна робота викладена на 146 сторінках друкованого тексту, складається зі вступу, анотації, огляду літератури, опису матеріалів та методів, результатів досліджень, їх обговорення, висновків та списку використаних літературних джерел, що включає 203 посилання. Робота містить 44 рисунки та 4 таблиці.

## РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.2. Ожиріння як глобальна проблема людства

Однією з найважливіших світових проблем сьогодення є ожиріння та його метаболічні ускладнення, зокрема резистентність до інсуліну та діабету 2 типу [10, 11]. Ця недавня епідемія не може бути пояснена раптовими змінами в генофонді людської популяції і в основному пояснюється змінами способу життя та впливом зовнішніх чинників. Розростання жирової тканини виникає переважно за рахунок дисбалансу між споживанням калорій і витратами енергії [12], але є і додаткові чинники: порушення сну і ендокринної системи, зниження фізичної активності, малорухливий спосіб життя, які стали важливими факторами, що сприяють зростанню популяції людей з ожирінням. Генетичну етіологію росту жирової тканини можна розділити на дві категорії: моногене, яке пов'язане з високим ризиком захворювання протягом життя. Синдромне ожиріння, що відноситься до моногенної категорії, відбувається одночасно з різним набором клінічних фенотипів, такі як розумова відсталість і дисморфічні особливості. Синдромні форми є результатом хромосомних аномалій та точкових мутацій, які можуть бути аутосомними розладами. Несиндромні форми викликані структурними варіаціями генів, залучених до шляху лептин/меланокортин, і характеризуються гіпертрофічними адипоцитами. Інші випадки даної патології можна пояснити узгодженою варіацією ДНК у кількох генах, відомої як полігене ожиріння [13].

Епідеміологічні дослідження пов'язують ожиріння матері до і під час вагітності з більш високою вагою при народженні дитини, це має особливе значення, оскільки збільшена маса жирової тканини новонародженого є ризиком дорослого ожиріння та метаболічного синдрому [14].

Підшкірна жирова тканина є органом зберігання енергії, причому жирова тканина може збільшуватися в розмірі по одному із двох шляхів: гіпертрофії (збільшення розміру адипоцитів) або гіперплазії (утворення нових адипоцитів) шляхом диференціації преадипоцитів. Число адипоцитів визначається на початку життя і в основному є стабільним у дорослому стані [5]. Одна із гіпотез, яка пов'язує

ожиріння з розвитком резистентності до інсуліну та діабету 2 типу, вказує на те, що з жирової тканини, що розростається, надходить багато FFAs до тканин печінки та м'язів і знижується чутливість до інсуліну цих тканин за рахунок ліпотоксичності, розвивається резистентність до інсуліну [15].

Механізм резистентності до інсуліну до сих пір повністю не з'ясований. Зв'язування інсуліну з його рецептором (IR), що складається з двох  $\alpha$ -ланцюгів і двох трансмембранних  $\beta$ -субодиниць, яким притаманна протеїнкізна активність, призводить до автофосфорилування рецептора інсуліну й подальшого зв'язування SH-2 домену адапторних протеїнів із субстратом інсулінового рецептора (IRS-1 і -2) та подальшої внутрішньоклітинної сигнальної трансдукції. Протеїни IRS містять декілька серин/треонінових залишків, які слугують негативними регуляторними мішенями і блокують сигналювання інсуліну. Існує декілька серин/треонінових кіназ, які активуються стресом ендоплазматичного ретикулума, включаючи JNK, прозапальну ІкВ кіназу (ІКК $\beta$ ) і протеїнкіназу С (PKC-block), й пригнічують сигналювання інсуліну через фосфорилування IRS по серину [16].

Стрес ендоплазматичного ретикулума є одним із основних показників діабету 2 типу, резистентності до інсуліну та ожиріння [15]. Механічно вільні жирні кислоти індукують стрес ER безпосередньо впливаючи на мембрану ER, блокуючи специфічний насос іонів кальцію, що призводить до накопичення неправильно згорнутих протеїнів. Окрім того, FFAs індукують стрес ER через активацію LPS-чутливих TLR рецепторів: TLR-2 / TLR-4 та активації ізозимної протеїнкінази С-тета (PKC-тета), яка є важливим медіатором запалення [12]. Висококалорійна дієта відіграє фундаментальну роль і в індукції стресу ER гіпоталамуса. TLR4 діє як рецептор насичених жирних кислот і зв'язування пальмітату з даним рецептором призводить до індукції запальних цитокінів гіпоталамуса, що послаблює сигналювання лептину та інсуліну [15].

Три сенсорно-сигнальні шляхи стресу ER, включаючи PERK (PRK-подібна кіназа ендоплазматичного ретикулума) (EC:2.7.11.1), яка представлена протеїнкіназою ER, фосфорилує  $\alpha$ -субодиницю фактора ініціації трансляції 2 еукаріот (EIF2A), інактивуючи її, що призводить до пригнічення трансляції мРНК і

блокади біосинтезу протеїнів. Це показано на рис. 1.1. Сигналізація PERK інгібує трансляцію ІКК $\beta$ , який є негативним регулятором NF $\kappa$ B, шляхом фосфорилування EIF2 $\alpha$  й порушує сигналювання інсуліну. ATF6 може також активувати NF $\kappa$ B за допомогою АКТ-опосередкованої деградації І $\kappa$ B, інгібітору NF $\kappa$ B. Інший сенсорно-сигнальний шлях стресу ER – ATF-6 (активууючий транскрипційний фактор 6), який при індукції стресу надходить до апарату Гольджі і розщеплюється протеазами S1P/S2P, у результаті чого утворюється розчинна форма ATF-6, яка транспортується до ядра і регулює експресію генів, що кодують шаперони та ферменти деградації протеїнів [17].

Найголовнішим сенсорно-сигнальним шляхом стресу ER є трансмембранний протеїн IRE/ERN1, який має серин/треонінову протеїнкіназу (ЕС:2.7.11.1) та ендорибонуклеазу (ЕС:3.1.26.) активності. За стресу ER відбувається активація й димеризація або олігомеризація IRE, після чого IRE1 аутофосфорилується і активується його протеїнкіназа та ендорибонуклеаза. Функція рибонуклеази полягає у вирізання 26-бр сегмента з мРНК транскрипційного фактора ХВР-1 (ген х-box зв'язування-1), у результаті чого утворюється активна/сплайсова форма мРНК ХВР-1, яка кодує більший за розміром протеїн і бере участь у регуляції експресії декількох сотень генів, причетних до правильного згортання протеїнів [18].

Сенсорна частина трьох сенсорно-сигнальних систем стресу ER знаходиться в люмені ER і взаємодіє з шаперонами, основним із яких є ВІР (immunoglobulin heavy chain binding protein), який відомий ще як HSPA5 (heat shock protein A 5) та GRP78 (glucose regulated protein 78). За нормальних умов він є негативним регулятором всіх сенсорно-сигнальних систем стресу (PERK, ATF6 та ERN1), а при появі у ендоплазматичному ретикулумі неправильно згорнутих протеїнів відщеплюється від них [19].

Фізіологічне ремоделювання і розростання жирової тканини повинні супроводжуватися змінами в капілярній мережі. Ці зміни відбуваються через тісний взаємозв'язок між судинними компонентами (ендотеліальними клітинами, перицитами й гладенько-м'язевими клітинами) та компонентами жирової тканини (пре-адипоцитами, мезенхімальними стромальними попередниками клітин,



фіброblastами, макрофагами і запальними клітинами). Ці перехресні шляхи мають сприяти диференціації нових преадипоцитів разом з утворенням нових судин, які забезпечують клітини киснем та поживними речовинами [14].

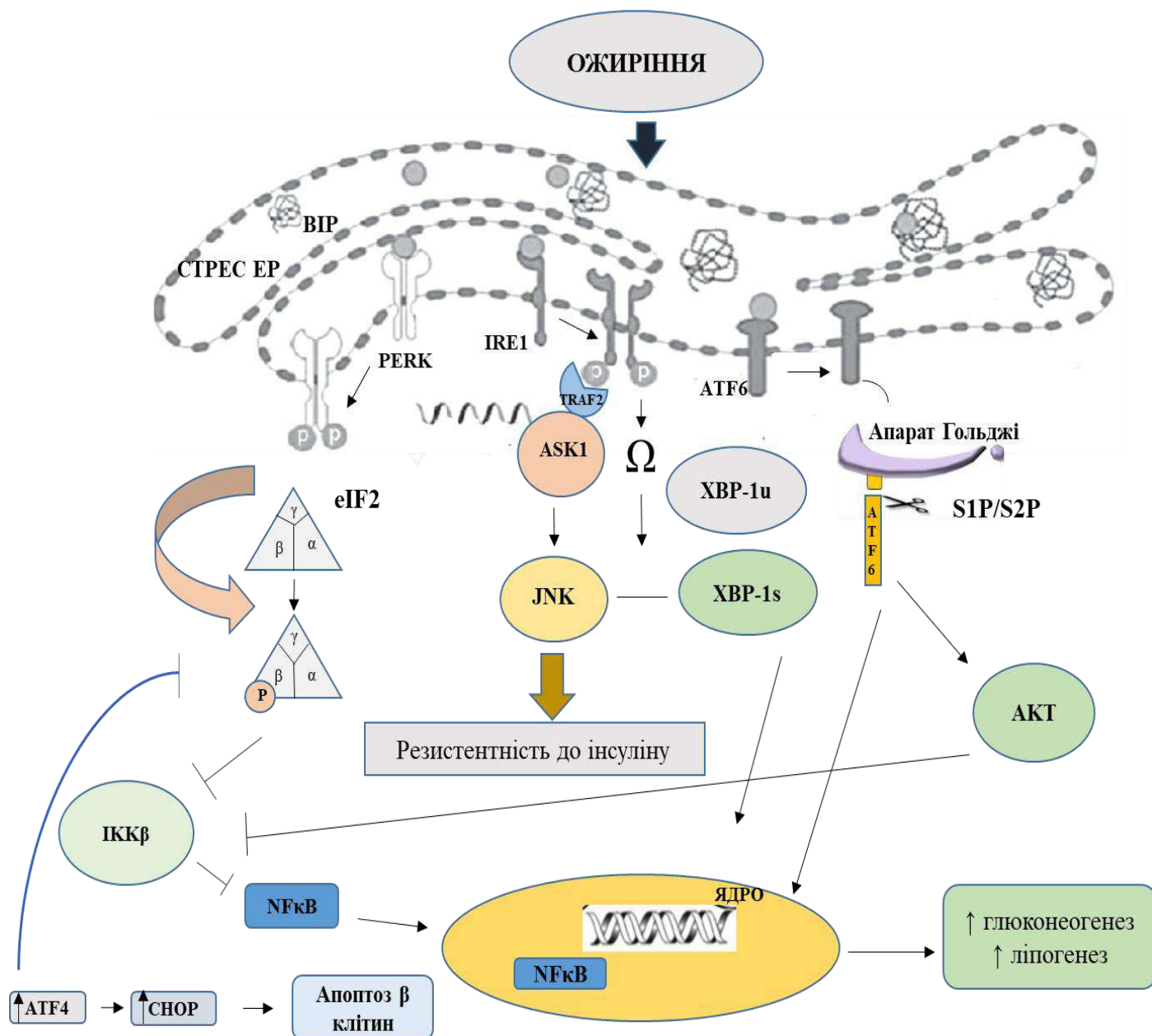


Рис 1.1. Роль стресу ендоплазматичного ретикулула за ожиріння

Індивідуальна схильність до ожиріння може виникати за рахунок поєднання екологічних, поведінкових, генетичних та епігенетичних факторів. Епігенетичні фактори включають зміни у метилуванні ДНК, модифікації гістонів і некодуючих РНК (ncRNA), включаючи мікроРНК, які можуть впливати на фізіологію клітин, а

отже впливати на чутливість до певних захворювань [20]. Мікро РНК, протеїни, які входять до складу екзосом та мікроевезикул інтенсивно вивільнюються у кровообіг під час ожиріння і можуть змінювати функції клітин-мішеней, взаємодія яких з екзосомами, призводить до активації сигнального шляху мітоген-активованої протеїнкінази (МАРК), що активує NFκB з подальшим збільшенням у синтезі прозапальних цитокінів [21]. Адипогенез жорстко регулюється набором транскрипційних факторів, таких як PPARγ, гормонами й іншими молекулами, які включають короткі й довгі ncRNA. У жировій тканині мікро РНК є важливим регулятором як адипогенного процесу, так і специфічних метаболічних функцій [22]. Гіперекспресія мікроРНК-377 підвищує чутливість до інсуліну (через інгібування SIRT1) і пригнічує диференціювання адипоцитів, що призводить до зниження сумарного накопичення ліпідів. При збільшенні жирової тканини можливе підвищення базального (спонтанного) ліполізу, в той час як ліполіз, що стимулюється катехоламінами, порушується. При цьому, гіперекспресія miR-30c, -652, -193b та -145 значно збільшує базальний ліполіз, в той час як надекспресія miR-26a і Let-7d інгібує стимульований ліполіз в адипоцитах людини [23, 24].

В дослідях на щурах було показано, що швидке розростання жирової тканини може супроводжуватися недостатнім ростом капілярної мережі і призводити до гіпоксії. Ожиріння є результатом інфільтрації макрофагів і збільшення синтезу запальних цитокінів та медіаторів, таких як TNF, інтерлекин-6 і -1бета [25-27]. Цей процес опосередковується через взаємодію цитокінів з комплексом TLR4, індукуючи NF-κB. Рецептори TLR-2 і TLR4 розташовані на клітинній мембрані, містять багаті лейцином повтори (LRR) і домен рецептора інтерлейкіну 1 (TIR), який полегшує взаємодію з протеїном цитоплазматичного адаптора MyD88 для ініціювання сигнального каскаду, що завершується активацією шляхів МАРК і ІКК, які сприяють вивільненню прозапальних цитокінів. Формування активного комплексу ІКК ініціює фосфорилування з наступною протеосомною деградацією внутрішньоклітинних інгібіторів (ІκВ), що призводить до вивільнення і транслокації фактора транскрипції NF-κB, який бере участь у проліферації, диференціації через регуляцію транскрипції численних генів [28]. За умов ожиріння можлива активація

про-запального процесу, яка ініціюється шляхом «адипоцит - макрофаг - TLR4». Отже, підвищення насичених вільних жирних кислот призводить до резистентності до інсуліну шляхом активації TLR4-опосередкованої сигналізації як в макрофагах, так і в адипоцитах, але вільні жирні кислоти не зв'язуються безпосередньо з TLR4, а з фетуїн–А, що є ендogenousним лігандом для TLR4 [29].

Жирова тканина секретує багато сигнальних протеїнів, відомих як адипокіни. Адипокіни – широкий спектр молекул, включаючи гормони, цитокіни і фактори росту, які виконують різноманітні функції в організмі, починаючи від контролю метаболічного гомеостазу до регулювання імунної системи й поведінки [30]. Лептин бере участь у підтримці енергії гомеостазу, призводить до зниження споживання їжі шляхом інгібування орексигенних і стимулювання анорексигенних нейронів у гіпоталамусі [31]. Біологічна функція цього гормону опосередковується шляхом його зв'язування зі своїм рецептором (LEPR), при цьому активується JAK2 тирозинкіназа, яка в свою чергу фосфорилує залишки тирозину на рецепторі лептину, а це призводить до посилення активності RAS-MAPK, PI3-кінази, STAT3 і STAT5 сигнальних каскадів [32]. Підвищення рівня лептину, що спостерігається за умов ожиріння у більшості людей, переважно є біомаркером резистентності до лептину, а це призводить до зниження здатності цього гормону пригнічувати апетит або підвищувати енерговитрати, посилює апетит і призводить до надмірної ваги. Одним із механізмів резистентності до лептину є порушення позаклітинної сигнально-регульованої кінази (ERK), яка є ключовим модулятором сигналювання лептину [33].

Адипонектин (Adipo Q), який є одним з основних адипокінів, що секретують виключно адипоцити, регулює як ліпідний, так й вуглеводневий метаболізм за допомогою двох своїх рецепторів - AdipoR1 і AdipoR2. Фактично, адипонектин діє як ендogenousний сенсibilізатор інсуліну: стимулює поглинання глюкози за рахунок активації окислення жирних кислот і зниження синтезу глюкози у печінці [34]. На моделі панкреатичного раку щурів, було показано, що адипонектин може інгібувати проліферацію пухлинних клітин, але молекулярні механізми цього залишаються ще не відомими. Хоча існує декілька припущень щодо інгібування прогресії даного

онкологічного захворювання: 1) безпосереднє активування шляху АМПК для активації p53, гена супресора пухлини і 2) стимулювання апоптозу пухлинних клітин через PPAR $\gamma$  та інгібування ангиогенезу [35].

Прозапальний стан жирової тканини за умов ожиріння, є основною етіологією розвитку різних видів онкологічних захворювань [36]. Запальні клітини генерують активні форми кисню й реактивні види азоту, індукують мутації ДНК в нормальному епітелії, що й призводить до трансформації клітин і утворення злоякісних пухлин [37]. Гіперекспресія лептину адипоцитами при розростанні жирової тканини є додатковим фактором, який сприяє злоякісному новоутворенню в молочній залозі через перехресний зв'язок даного гормону з ароматазою, і як результат – підвищення рівня естрогенів через (MAPK) / 1/2 (ERK1 / 2)' - STAT3 і (PI3K) шляхи [29]. Нещодавно було описано важливу роль інфламасом як важливого джерела запалення жирової тканини, а в адипоцитах посилюється експресія багаточисленних генів, продукти яких входять до інфламасоми. Це гени Nod-подібних рецепторних шляхів NLRP3 і PYCARD (PYD-PYRIN-PAAD-DAPIN і CARD, CASP1, TLR та TNF- $\alpha$ ), активація яких сприяє росту пухлин і їх метастазуванню у людей [38].

Активність білої жирової тканини демонструє добову ритмічність з щоденними коливаннями в експресії генів, які залучені в метаболічні процеси, такі як ліпідний обмін та енергетичні витрати. Біологічний годинник складається з транскрипційних та інших факторів, серед яких: BMAL, CLOCK, PER1-PER3, CRY1, CRY2 та ряд інших. Ключові ферменти ліполізу, включаючи адипоцитарну ліпазу тригліцеридів (ATGL) і гормонально-чутливу ліпазу (HSL), знаходяться під контролем транскрипційних генів циркадіального годинника BMAL1 / CLOCK і зміна їхніх біологічних активностей у кінцевому рахунку впливає на рівень вільних жирних кислот, що показано на трансгенних щурах. Дослідження, проведені на людях, демонструють, що багато циркулюючих метаболітів, більшість із яких є ліпідними продуктами, показують циркадіальні коливання, що вказує на специфічну роль ендогеного біологічного годинника в регуляції ліпідів у плазмі крові. У людей вимушена десинхронізація біологічного годинника шляхом зміни режимів

харчування та сну призводить до зниження рівня лептину у плазмі й підвищення рівня глюкози й інсуліну. Ці зміни в ендокринній системі вказують на те, що циркадіальний зсув може впливати на обмін жирової тканини й призвести до розвитку ожиріння [39].

## **1.2. Ключова роль факторів, які контролюють процеси ангіогенезу**

Ангіогенез та адіпогенез розглядаються як паралельні процеси, де відбувається утворення нового капілярного русла в поєднанні з розростанням жирової тканини. Але можливо, що один із цих двох процесів передує іншому. Ріст нових судин є складно скоординованим процесом, який потребує послідовності в активації певних рецепторів в клітинах ендотелію судинних стінок численними лігандами [40]. Однак, неконтрольована неоваскуляризація може сприяти розвитку ряду патологічних станів, включаючи ріст пухлин і метастазування. Відомо, що ангіогенез знаходиться під контролем про-адипогенних та ангіогенних факторів, таких як ендотеліальний фактор росту судин А і В (VEGF-A, VEGF-B), фактор росту фібробластів-2 (FGF2), ангіопетини 1–2 (Ang-1 та Ang-2), лептин, адипонектин і HIF-1A, а також анти-ангіогенних факторів, включаючи тромбоспондин-1, ангіостатин або інші модулятори, такі як інгібітор активатора плазміногену 1 [41, 42].

Ангіогенез складається з декількох послідовних етапів: деградації базальної мембрани, фібрину й позаклітинного матрикса, міграції ендотеліальних клітин, її проліферації й формування нових капілярних трубок, базальної мембрани й встановлення кровообігу. Початкова стимуляція проліферації ендотеліальних клітин опосередковується родиною факторів VEGF, які являють собою гепарин-зв'язуючі протеїни. Зокрема, VEGF-A, який зв'язується з VEGFR2 (рецептор VEGF 2, також відомий як KDR у людей, або Flk1 у щурів), а також VEGFR1, гепарансульфатом і гепарином, і являє собою найбільш потужний мітогенний і хемо-атрактантний сигнал для ендотеліальних клітин [43]. Фізіологічне проростання судин вимагає збалансованого утворення нової клітини, які тонко регулюються Notch

сигналізацією. VEGF індукує експресію дельта-подібного ліганда (Dll4), який приєднується до Notch1 рецепторів й знижує експресію гена *VEGF*, при цьому запобігаючи зайвому ангиогенезу [44-46]. Порушення сигналізації Notch спостерігається при ангиогенезі пухлинних клітин [47]. Резистентність до ендотеліального фактора росту призводить до ендотеліальної дисфункції, яка спостерігається за цукрового діабету при наявності функціонального рецептора VEGF [48]. Численні дослідження показують, що дія інсуліну може підвищувати рівень VEGF через p38 MAPK і PI3K-Akt, але не через p42 / p44 MAPK чи PKC шляхи, що призводить до синтезу NO, який регулює проникність судин [49, 50]. Основним сигналом, який індукує ангиогенез, є гіпоксія, але інші фактори також можуть бути відповідальними за це: гіпоглікемія, гіпертонічна хвороба, механічний стрес, хронічне запалення. Гіпоксичні тканини вивільняють фактор HIF-1, який активує транскрипцію генів *VEGF*, *FGF* та *PDGF* [51]. За наявності достатньої кількості кисню, HIF-1A гідроксильується в залишках лізину й деградує, у той час коли за гіпоксії відбувається інгібування пролін-гідроксилази, що призводить до активації даного транскрипційного фактору [52, 53]. Молекулярний механізм активації HIF за умов нейрозапалення включає активацію TLR за рахунок MAPK і NF-κB шляхів. Транскрипційний фактор HIF-1A регулює деякі про-апоптичні гени, включаючи протеїн 3, що взаємодіє з Bcl-2 (BNIP3) і стабілізує пухлинний супресор p53, необхідний для індукування апоптозу клітин [54], [55]. Протеїн PDGF-C - є ангиогенним фактором [56], що зв'язується зі своїм рецептором-кіназою PDGFRα, і PDGF сигналізація активує переважно PI3K-AKT сигнальний шлях [57] [58]. Завдяки наявності висококонсервативного цистеїнового мотиву, PDGF-C належить до PDGF / VEGF родини [59]. Тромбоцитарний фактор росту C має N-термінальний CUB домен, який блокує зв'язування C-кінцевого фактора росту зі своїм рецептором і має бути протеолітично розщеплений для індукції сигналювання. Плазмін і тканинний активатор плазміногену (tPA) розщеплює PDGF-C [60], у результаті чого утворюється активна форма даного фактора росту, яка індукує ангиогенез завдяки його здатності рекрутувати ендотеліальні клітини, перицити і гладком'язові клітини, захищає макрофаги від апоптозу, які, у свою чергу, є джерелом ангиогенних

факторів [61]. Порушення регулювання системи PDGF / PDGFR, так як і конститутивна активація PDGFR або мутації, які підвищують / знижують активність лігандів та рецепторів, сприяють утворенню остеосарком, карцином легенів, гліом [62-64].

Фактори росту фіброblastів FGF1 і FGF2 зв'язуються із специфічними клітинними рецепторами FGF-R1-4 й з гепарансульфатними протеогліканами, які володіють тирозинкіназною активністю, ініціюють димеризацію рецепторів й автофосфорилування його тирозинкіназних доменів з подальшою активацією внутрішньоклітинної сигналізації, включаючи Ras / MAPK, PI3K / Akt і PLC $\gamma$  / PKC, що сприяє ангіогенезу, проліферації, міграції та диференціюванню різних клітин, що показано на рис 1.2. [65-68].

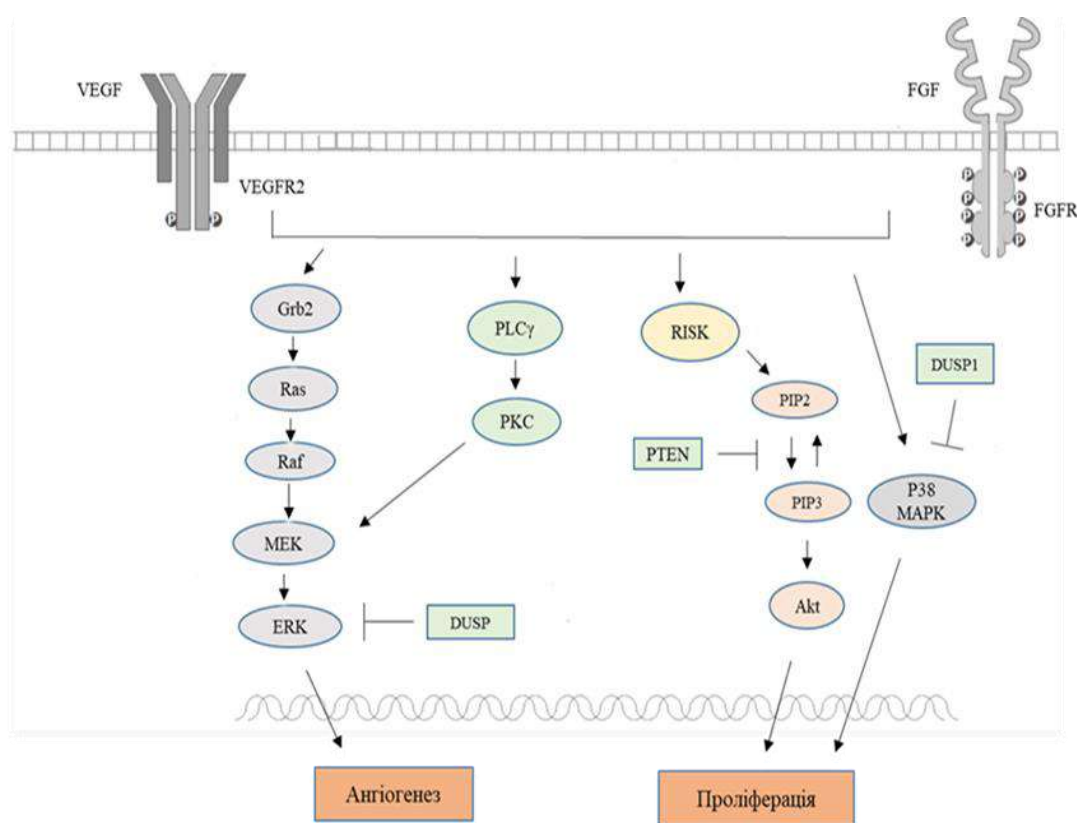


Рис. 1.2. Молекулярні механізми регуляції ангіогенезу та проліферації за участі VEGF і FGF

Доведено, що FGF1 активує експресію PPAR, сприяючи адипогенезу [69] за рахунок активації канонічної сигналізації FGF1 шляхів: рецептора фактора росту фіброblastів FGFR1/субстрату фактора росту фіброblastів2 (FRS2)/PI3K [70].

Синтез FGF2 і його вивільнення з ендотеліальних клітин може бути викликане медіаторами запалення, такими як L-1 $\beta$ , NO, простагландин E2. Також FGF1 може пригнічувати про-апоптичну активність p53 шляхом фосфорилування серину в 15-му положенні та сприяти його деградації, що показано для пухлинних клітин яєчників [71-73]. Існують перехресні шляхи між FGF2 і VEGF-A для стимуляції ангиогенезу: FGF2 збільшує проникність судин через VEGF-A [74, 75]. Мутація FGFR2 переважно пов'язана з раннім етапом карцином ендометрія. FGFR1 не має внутрішньоклітинного тирозинкіназного домена і може функціонувати як особливий рецептор, зокрема в аденокарциномах ендометрію [76]. Досліди показують існування взаємозалежного автокринного / паракринного зв'язку між FGF, PDGF і VEGF і їх функціональними рецепторами в ракових клітинах ендометрію й збільшена експресія цих лігандів призводить до підвищення ангиогенезу пухлин [76]. E2F8 – транскрипційний фактор, містить два ДНК-зв'язуючих домена, зв'язується на промоторі генів-мішеней і регулює їхню експресію, сприяє ангиогенезу шляхом стимулювання транскрипції гена VEGFA в гіпоксичних клітинах [77, 78].

### **1.3. Вплив ожиріння на регуляцію фібринолітичної системи**

Протягом останніх двох десятиліть клінічні дослідження більш чітко продемонстрували, що ожиріння пов'язане з порушенням фібринолізу. Активація прозапальних цитокінів при розростанні жирової тканини, збільшує експресію С-реактивного білка, сироваткового амілоїду-А та інгібітору активатора плазміногену-1 (PAI-1) [79]. За нормальних фізіологічних умов PAI-1 секретуються двонаправлено ендотеліальними клітинами і діє як первинний регулятор фібринолізу, так і як модулятор протеолізу позаклітинного матриксу, але його дисрегуляція призводить до різних аномалій [80]. PAI-1 зв'язується та інгібує активатори плазміногену – tPA (EC:3.4.21.68) і Uro (EC:3.4.21.73). Збільшення концентрації вільних жирних кислот у крові призводить до збільшення рівня експресії гена *PAI-1* у жировій тканині, але найбільшим стимулятором



гіперекспресії *PAI-1* у жировій тканині є  $\text{TNF-}\alpha$  і лептин [81-84], а це призводить до зменшення секреції плазміну та зниження розчинення фібринових згустків. Протеїн *PAI-1* є про-ангіогенним фактором у пухлинних клітинах, підвищена його експресія може збільшити ризик метастазів карциноми голови та шиї опосередкованого активацією шляху  $\text{PI3K} / \text{AKT}$ . Більше того, було показано, що збільшена експресія транскрипційного фактора  $\text{FoxO3a}$  призводила до посилення здатності інсуліну активувати *PAI-1*. Додаткові дослідження показали, що зниження  $\text{FoxO3a}$  інгібує інсулін-підвищену експресію *PAI-1* [62, 85].

Активатор плазміногену урокіназного типу (*PLAU*; *uPA*) – високоспецифічна серинова протеаза, яка є важливим регулятором плазміногену. Вона бере участь у сигналізації клітини шляхом зв'язування з рецептором *PLAU* (*PLAUR*; *uPAR*) з подальшою взаємодією цього комплексу з іншими протеїнами. Сигнальними ко-рецепторами *PLAUR* є інтегрини, які являють собою  $\alpha\beta$ -гетеродимерні трансмембранні рецептори і зв'язують компоненти позаклітинного матриксу з цитоскелетними протеїнами. Рецептор *PLAUR* взаємодіє з сайтами зв'язування інтегринів, які розташовані в двох областях ( $\text{DII}$  та  $\text{DIII}$ ) і мають вирішальне значення для процесів проліферації, міграції та виживання клітин. *PLAU* може брати участь у процесах трансформації клітин шляхом перетворення про-калогенази в її активний стан і таким чином стимулювати ріст пухлин. Крім того, до васкуляризації пухлин можуть бути залучені система *PLAU-PLAUR-PAI-1* за рахунок впливу на міграцію ендотеліальних клітин, а також утворення тромбів [67]. Доведено, що через  $\text{VEGFR-2}$  і  $\text{PI3-кіназу}$  - опосередкована інактивация  $\beta 1$  інтегринів, а це призводить до стимуляції трансмембранної металопротеїнази типу 1 ( $\text{MT1-MMP}$ ), опосередкованої активацією матриксної металопротеїнази-2 ( $\text{MMP-2}$ ), яка активує про-*uPA* (попередник *uPA*) і таким чином індукує *uPA*-залежний перицелюлярний протеоліз та стимулює клітинну інвазію ендотеліальних клітин, опосередковану  $\text{VEGFR2}$ , але не  $\text{VEGFR-1}$  [86-88]. Дослідження показали, що *uPAR* проявляє сильну спорідненість до  $\alpha 5\beta 1$  (рецептор фібронектину) шляхом взаємодії з доменом  $\text{III PLAUR}$ , а це призводить до індукції проліферації клітин шляхом активації  $\text{ERK}$  [89]. Рецептор *PLAU* (також відомий ще як  $\text{CD87}$ ) – глікопротеїн,

який прикріплений до плазматичної мембрани й сприяє міграції клітин через здатність посилювати і фокусувати експресію урокіназного типу активатора плазміногену до дискретних ділянок клітинної поверхні [90]. У злоякісних клітинах рецептор VEGF може взаємодіяти з інтегринами і посилювати сигналізацію інтегринів. У координації з рецептором фактора росту, інтегрини можуть модулювати функції клітин шляхом зв'язування з відповідним лігандом. Показано, що інтегрин  $\alpha\beta 1$  інгібує клітинну адгезію [91]. ITGAM (також відомий як CD11b) є членом родини інтегринів альфа ланцюга, експресується в різних типах клітин, включаючи макрофаги, моноцити та нейтрофіли, формує гетеродимер з інтегрином бета-2 (ITGB2) і зв'язується з широким діапазоном лігандів, включаючи білки згортання крові (фібронектин та молекули міжклітинної адгезії 1 і 2). Більше того, інтегрин CD11b активує адгезію і міграцію лейкоцитів з кровотоку [92].

Отже, ожиріння характеризується про-запальним станом, що призводить до змін фібринолізу, в результаті чого значно збільшується ризик виникнення серцево-судинних захворювань, а тому дослідження показників гомеостазу при збільшенні маси жирової тканини допоможуть ліпше зрозуміти патогенез серцево-судинних захворювань за умов ожиріння.

#### **1.4. Молекулярні механізми регуляції метаболізму сигнальними шляхами**

Ожиріння та його метаболічні ускладнення є важливою проблемою людства і асоціюється з дисрегуляцією основних метаболічних ускладнень, включаючи клітинну проліферацію й чутливість до інсуліну [93]. Ожиріння як і метаболічний синдром є результатом тісних взаємозв'язків між генами і зовнішніми факторами. Деякі молекулярні та клітинні дослідження продемонстрували взаємозв'язок між розвитком метаболічних ускладнень і змінами добових ритмів через дисрегуляцію експресії циркадіальних та низки інших генів, включаючи гени, які кодують протеїнкінази і протеїнфосфатази, відповідно для фосфорилування та дефосфорилування різних регуляторних факторів. Протеїнфосфатази регулюють

широкий спектр різних фізіологічних станів, включаючи клітинний ріст і проліферацію, функцію та біогенез мітохондрій, активують фактори, які пов'язують резистентність до інсуліну, ожиріння і метаболічні ускладнення [94, 95].

Ожиріння, як і резистентність до інсуліну, пов'язані з прозапальними процесами та активацією стресових реакцій у клітинах жирової тканини. Підвищення рівня вільних жирних кислот і цитокінів є необхідною умовою активації стресових шляхів, які перешкоджають передачі сигналів від інсуліну та призводять до зниження відповіді на інсулін. Причому гіперактивація MAP-кіназ (ERK 1 і 2) і кінази SAP (JNK і p38MAPK) є вирішальними в розвитку резистентності до інсуліну. Однією із мішеней MAP і SAP кіназ є субстрат інсулінового рецептора IRS-1, який фосфорилується кіназами по залишкам серину. Це погіршує здатність рецептора інсуліну до фосфорилування IRS-1 по залишку тирозину і тим самим знижує його здатність взаємодіяти з компонентами сигнальної мережі інсуліну. MAPKs складається з п'яти  $\beta$ -складок на N-термінальній послідовності й шести  $\alpha$ -спіралей на C-термінальній послідовності. Виявлено, що ці протеїнкінази містять сайт зв'язування на C-кінцевій послідовності, який зв'язує консервативну послідовність з 13-16 амінокислот і називається CD-мотив (мотив, що взаємодіє з кіназою). Для CD-мотива точно встановлена консенсусна послідовність (R / K) 2-3-X2-6-UA-X-UB (U - будь-який гідрофобний залишок). MAPKs – група висококонсервативних тирозин/треонінових протеїнкіназ, які є не активними до тих пір, доки вони не стануть фосфорильованими за допомогою кінази кіназ MAPK кіназ (MAPKKs) у межах їхніх активних ділянок (TxY мотиву) по залишках треоніну і тирозину для набуття активної конформації [96]. Після активації, MAPKs фосфорилують безліч субстратів для регулювання проліферації, диференціації та апоптозу клітин, процесів росту та метаболізму [97]. Блокування цих стресових кіназ має потенціал для запобігання розвитку резистентності до інсуліну [98].

Серед негативних регуляторів, які змінюють інтенсивність і тривалість реакцій стресу, найбільш прямими регуляторами MAPK є родина МКР фосфатаз або подвійних специфічних фосфатаз (DUSP), які відносяться до родини біспецифічних

протеїнфосфатаз. Вони дефосфорилують і тим самим інактивують MAP-кінази та SAP-кінази по треонінових/серінових залишках [99]. Хоча MAP і SAP кінази були широко вивчені в регуляції дії інсуліну, роль MKPs за умов ожиріння залишається в значній мірі не відомою [100]. MKPs індуються різними стимулами, і їх локалізація визначає компартмент, у якому вони знаходять їхні мішені. Це важливо тому, що кінази MAP та SAP можуть транслокуватися від цитоплазми до ядра і фосфорилувати там широкий спектр протеїнів [101].

Родину DUSP поділяють на три підродини на основі доменної структури, гомологічних послідовностей та субклітинної локалізації. Перша підродина DUSP складається з ензимів, локалізованих в ядрі: DUSP1 / MKP1, DUSP2 / PAC-1, DUSP4 / MKP2 та DUSP5 / HVH3, які дефосфорилують всі три MAPKs всередині ядра. Друга група локалізована в цитоплазмі і включає DUSP6 / MKP-3, DUSP7 та DUSP9 / MKP4, які в значній мірі специфічні до дефосфорилування ERK1 / 2. Остання група протеїнфосфатаз DUSP включає ензими, локалізовані у цитоплазмі та ядрі, включаючи DUSP8 (M3 / 6), DUSP10 / MKP5, DUSP14 / MKP6 і DUSP16 / MKP7, які мають більшу специфічність для JNK і p38, хоча DUSP14 також бере участь в інактивації трансформуючого фактора росту бета-активованої кінази 1 (TAK1), причому DUSP8, мабуть, є більше специфічною для ERK1 / 2 [100].

Усі три підродини протеїнфосфатаз DUSP мають NH<sub>2</sub>-кінцеву область, що складається з двох гомологічних доменів CDC25 та проміжного кластера амінокислот, відомого як мотив MAP-кіназ (МКВ), або кіназно-взаємодіючий мотив KIM: це МКВ / KIM мотив DUSP взаємодіє з загальним доменом (CD) MAP-кіназ, який містить дві негативно заряджені аспарагінові кислоти і кластер позитивно заряджених амінокислот [97], для опосередкування взаємодії фермент-субстрат, та COOH-кінцевого подвійно-специфічного фосфатазного домена, з консервативними залишками аспарагінової кислоти, цистеїну й аргініну, які формують каталітичний сайт, тоді як у 19 атипових і низькомолекулярних DUSP відсутній МКВ [102-104]. Прикладами атипових DUSP є DUSP3, 14, 22 і 27. Фосфатаза DUSP22 необхідна для повної активації сигналізації JNK шляху.

Каталітичні домени всіх подвійних специфічних протеїнфосфатаз мають унікальний мотив консенсусної послідовності (H / V) CX<sub>5</sub>R (S / T), де X позначає будь-який залишок амінокислот. Залишки цистеїну та аргініну в активному сайті, що містяться в мотиві «Р-петля», є критичними для зв'язування субстрату. Через їх центральну роль у залежних від фосфорилування клітинних шляхах, модуляція активності DUSP може мати терапевтичний ефект за багатьох хронічних і інфекційних захворювань людини [102].

Активність та експресія протеїнфосфатаз DUSP регулюється на різних рівнях й залежить від типу клітин. Фактично, експресія DUSP швидко збільшується при стимуляції рецептором фактора росту. Декілька транскрипційних факторів, які активують MAPK шляхи, є відповідальними за швидку експресію генів DUSP. Це означає, що MAPKs, які діють як субстрати DUSP, є відповідальними за транскрипційну індукцію генів родини *DUSP*. Крім того, для індукції деяких DUSPs необхідні стресові умови, які можуть активізувати транскрипційну активність промоторів їх генів [105, 106].

Одним із членів родини протеїнфосфатаз DUSP, який селективно дефосфорилує ERK1/2 є DUSP6 (MKP-3), (EC:3.1.3.16; EC:3.1.3.48) - конститутивна білкова фосфатаза, що регулює базальний рівень фосфорильованих ERK у цитозолі і є негативним регулятором цієї протеїнкінази. Протеїнфосфатаза DUSP6 може індукуватися транскрипційним каскадом Ras / MEK / ERK, який ініційований фактором росту FGF. Активація ERK також регулює експресію та стабільність протеїну DUSP6 через його пряме фосфорилування. Збільшена експресія DUSP6 спостерігається у деяких видах злоякісних пухлин (клітинах меланоми й гліоми) і це дозволяє припустити, що дана фосфатаза може бути причетна до росту пухлин. Крім того, було виявлено зниження експресії гена *DUSP6* у деяких клітинах пухлин яєчників та легенів, де ця протеїнфосфатаза може проявляти роль пухлинного супресора [105]. На лінії щурів ob/ob було показано, що за умов ожиріння спостерігається зміна активності протеїнфосфатази DUSP6, причому нокдаун експресії DUSP6 супроводжувався зниженням рівня глюкози в крові цих щурів ймовірно через дефосфорилування p38, а ектопічна надекспресія DUSP6 сприяла

транскрипції глікогенних генів шляхом дефосфорилювання ядерного білка FOXO1 [107]. Разом з тим, потрібні подальші дослідження для перевірки значення протеїнфосфатази DUSP6 як кандидата в протеїни мішені з метою лікування гіперглікемії, пов'язаної з ожирінням та цукровим діабетом 2 типу.

Протеїнфосфатаза DUSP1 (або MKP1), (EC:3.1.3.16; EC:3.1.3.48) - перший MKP, який виявився специфічним для MAPK, дефосфорилює як залишки треоніну, так і залишки серину членів всіх трьох підродин MAPK - ERK2, JNK1 та p38-alpha [108-111]. Ця протеїнфосфатаза є ядерним протеїном, що складається з 367 амінокислот, експресується у різних тканинах людини, а також залучений до регуляції клітинного циклу та апоптозу [96, 112-114]. Протеїнфосфатаза MKP-1 може індукуватися факторами росту, оксидативним стресом та кількома цитокінами, включаючи фактори TNF і TGF. Оскільки MKP-1 функціонує як деактиватор MAPKs, було запропоновано, що MAPKs можуть активувати транскрипцію MKP-1 [115]. Показано, що у гладеньком'язових клітинах судин фактор росту тромбоцитів (PDGF) активує ERK і є потужним стимулом для JNK та p38, а також індукує експресію гена *MKP-1*. Запропоновано епігенетичний механізм модуляції експресії *MKP-1*: фосфорилювання і ацетилювання гістону H1 змінює хроматин у локусі гена *MKP-1*, що призводить до підвищеної взаємодії РНК-полімерази II з промотором гена *MKP-1*, в результаті чого відбувається активація транскрипції *MKP-1*. DUSP-1 містить залишок цистеїну (Cys258) у каталітичному домені, який окиснюється активними формами кисню (ROS) та інактивує ензим MKP-1, який зазнає швидкої деградації у протеосомі [116]. Таким чином, зміна активності протеїнфосфатази DUSP1 асоціюється з різними захворюваннями людини, включаючи артрит, діабет та онкологічні захворювання.

Протеїнфосфатаза DUSP4 (MKP-2), (EC:2.7.11.25) регулюється, головним чином, на рівні транскрипції, до чого залучаються MAP кінрази та транскрипційні фактори p53 і NOXA10. Результати досліджень, проведених *in vitro*, показали, що DUSP4 переважно дефосфорилює ERK і JNK, але не p38 MAP кінразу, і індукується факторами росту або сигналами стресу [117]. Протеїнфосфатаза MKP-2 виступає в якості потенційного ERK регулятора проліферації пухлинних клітин [118].

Надекспресія MKP-2 негативно регулює JNK-сигналювання і, як наслідок, зменшує JNK-залежний апоптоз [119, 120].

Тирозинфосфатаза PTEN (EC:3.1.3.67; EC:3.1.3.16; EC:3.1.3.48) інгібує клітинний цикл у фазі G0-G1 і призводить до апоптозу клітин. Протеїн PTEN містить N-кінцевий фосфатазний каталітичний домен та C-кінцевий зв'язуючий ліпідний C2 домен, який бере участь у селективному зв'язуванні з мембранами та дефосфорилує PIP3. Тирозинфосфатаза є негативним регулятором шляху PI3K/Akt після каталітичного перетворення PI (3,4,5) P3 в PI(4,5) P2, що призводить до інактивації PI3K. Відомо, що делеція гена *PTEN* посилює активність сигнального шляху інсуліну і сприяє поліпшенню поглинання глюкози в м'язевій та жировій тканинах, а інсулін збільшує глюконеогенез та глікогеноліз для зниження рівня глюкози в печінці. Крім того, дефектний ген *PTEN* характеризується як потенційний супресор при ракових захворюваннях, у результаті чого підвищується рівень PI (3,4,5) P3 і активується Akt, внаслідок чого постійно генерується сигнал до поділу клітин, що характерно для росту злоякісних пухлин [121]. Показано, що в ядрах деяких клітинних ліній PTEN стимулює транскрипційну активність ядерного транскрипційного фактора супресора пухлин p53 [122].

Детальний молекулярний механізм залучення регуляції протеїнфосфатаз родини DUSP до розвитку ожиріння та його метаболічних ускладнень вивчений ще недостатньо, хоча відомо, що дисфункція деяких DUSP тісно пов'язана з порушенням метаболічного гомеостазу в результаті змін у внутрішньоклітинних сигнальних мережах і це сприяє розвитку ожиріння.

### **1.5.Значення факторів росту в процесі диференціювання адипоцитів**

Ріст жирової тканини тісно пов'язаний зі збільшенням експресії та активності численних факторів росту. Великий інтерес представляють матриксні протеїни, які пов'язані з ожирінням й метаболічними ускладненнями у людей, тому що регулюють клітинний ріст [123]. За адипогенезу мезехімальні клітини-попередники перетворюються в преадипоцити в результаті активації транскрипційних факторів,

які потім диференціюються до зрілих адипоцитів і перебувають у стані спокою. Цей процес диференціювання залежить від експресії таких важливих транскрипційних факторів як C/EBP та PPAR, а їх підвищена активність сприяє індукції експресії протеїнів, які беруть участь у зберіганні ліпідів, чутливості до інсуліну та термінальній диференціації адипоцитів. Диференціація адипоцитів також залежить від реорганізації позаклітинного матриксу, процесу, який опосередковується матриксною металопротеїназою (ММР), і може модулювати рівень CTGF (CCN2) в адипоцитах, а ММР, у свою чергу, знаходиться під контролем тканинного інгібітору металопротеїназ (TIMP-1). Доведено, що CTGF може модулювати рівень PAI-1 в адипоцитах і тим самим змінювати їх диференціювання [124]. Цей фактор росту сполучної тканини є членом родини CCN, він є сингальним протеїном, багатим на цистеїн, і зв'язує гепарин [125]. CTGF складається з чотирьох високонсервативних доменів: домена, що зв'язує подібний до інсуліну фактор росту (IGF) та фактор Вілленбранда типу С (vWC), домена тромбоспондинового повороту типу 1 (TSR) і С-кінцевого домена з цистеїновим мотивом (СТ), за рахунок яких інтегруються різноманітні сигнали біологічної відповіді [126, 127]. Цей фактор росту опосередковує свою дію через зв'язування з різними рецепторами поверхні клітин, включаючи інтегринові рецептори та гепарансульфатні протеоглікани клітинної поверхні, а також із ендотеліальним фактором росту судин, контролюючи таким чином клітинну сигналізацію, адгезію, міграцію і ангиогенез. CTGF може інгібувати VEGF-індукований ангиогенез за допомогою утворення комплексу з VEGF (взаємодія протеїнів), однак стабільність цього комплексу залежить від матриксних протеїназ [128]. Встановлено, що надекспресія CTGF сприяє фосфорилуванню PLC, яка є потенційним кандидатом сигнального шляху, що опосередковує інвазію пухлинних клітин, метастазування та ангиогенез [129, 130]. CCN2 може сприяє і адгезії та міграції мікросудинних ендотеліальних клітин через інтегрин- $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -залежний механізм [131]. Показано також, що ERK активує експресію CTGF у різних типах клітин, у тому числі й адипоцитах, причому на моделі NP-клітин було показано, що IL-1 $\beta$  і TNF- $\alpha$  пригнічують експресію фактора CTGF через сигнальний шлях NF- $\kappa\text{B}$  [132].



В регуляції клітинного циклу та процесів проліферації задіяний також фактор росту жирової тканини EGFL6 (MAEG), що посилено експресується за ожиріння [133]. Протеїн EGFL6 є членом родини EGF з виражено підвищеною експресією в підшкірній жировій тканині, причому є паракринним/автокринним епідермальним фактором росту жирової тканини [134]. Він містить структурні домени: N-кінцевий сигнальний пептид, інтегрин-зв'язуючий мотив Arg-GlyAsp (RGD), а також до мефрину, протеїну A та домен рецепторного протеїну MAM і сприяє проліферації преадипоцитів та стимулює збільшення жирової тканини [134]. Крім того, EGFL6 здатний стимулювати клітинну міграцію й ангиогенез через активацію ERK шляху [135]. Припускають, що MAEG регулює ембріогенез за рахунок домену RGD через інтегрини. Лігування інтегринів призводить до активації різноманітної сигнальної трансдукції, включаючи PI3K / Akt і MEK / ERK, які відповідають за проліферацію, міграцію та виживання клітин [136, 137].

MYLK кодує Ca<sup>2+</sup> / кальмодулін (CaM) – залежну міозинову кіназу легкого ланцюга (MLCK), яка фосфорилує регуляторний легкий ланцюг міозину, що полегшує об'єднання міозину з F-актином для ініціювання скорочення в гладеньком'язових клітинах [138, 139]. Рухомість клітини, що важлива для інвазії пухлинних клітин і метастазування, обумовлена циклами полімеризації актину, клітинної адгезії та актино-міозинового скорочення. Встановлено, що скорочення актину-міозину призводить до морфологічного ремоделювання злоякісних клітин і реорганізації позаклітинного матриксу, полегшує рух клітин. Протеїн MYLK може регулювати актиновий цитоскелет шляхом фосфорилування легких ланцюгів міозину [140]. Збільшення активності circRNA-MYLK підвищує рівень експресії VEGFA і VEGFR2 через Ras / ERK сигнальний шлях, сприяючи клітинній проліферації, інвазії та проліферації пухлинних клітин *in vivo*, що показано на моделі аденокарциноми сечового міхура. Кільцеві РНК (circRNAs) – клас некодуючих РНК, які утворюються шляхом не послідовного зворотного сплайсингу пре-мРНК транскриптів, також задіяні в рості жирової тканини, хоча їх функціональне значення значною мірою залишається ще неясним [141].

Збільшення жирової тканини асоціюється також і з підвищеною експресією мезодермального специфічного транскрипту MEST (PEG1), який належить до родини  $\alpha/\beta$ -гідролаз, що мають різні каталітичні активності [142]. Крім того, MEST містить каталітичну тріаду: серин-гістидин-аспартат (амінокислоти 145-147), яка присутня у великій кількості ферментів, включаючи ліпази й ацилтрансферази і свідчить про його роль у метаболізмі тригліцеридів, ліпогенезі та модулюванні рівня діол-похідних жирних кислот, що є ендogenousними медіаторами PPARs [143, 144]. Існують докази того, що лише батьківська алель Peg1/Mest експресується в жировій тканині за ожиріння. Ген MEST людини знаходиться у 7q32.2 локусі хромосоми поблизу розташування людського лептину (7q32.1) і у зв'язку з цим може впливати на індекс маси тіла [145]. Відомо, що активація MEST пригнічує WNT сигнальний шлях [146], але для з'ясування регуляторних механізмів функціонування цього гена за ожиріння необхідні подальші дослідження.

Важливу роль в регуляції росту жирової тканини відіграє також протеїн CTNRC1, який інгібує диференціацію адипоцитів як *in vivo*, так і *in vitro* шляхом пригнічення PPAR сигналізації та активації CREB [147]. CTNRC1 - це глікопротеїн екстрацелюлярного матриксу, що містить NH<sub>2</sub>-кінцевий сигнальний пептид для позаклітинної секреції, короткий колагеновий повтор з трьома спіралями із 36 амінокислот і COOH-кінцевий глобулярний домен. Він є критичним регулятором розвитку пухлин, метастазів та інвазії у мікрооточенні пухлини. CTNRC1 може взаємодіяти з кількома позаклітинними компонентами сигналізації Wnt, включаючи ко-рецептор Wnt/PCP Ror2. CTNRC1 може одночасно активувати сигнальний шлях Wnt/PCP через підвищену регуляцію протеїнів Wnt5a, Ror2 та p-c-Jun й сприяти клітинній інвазії та проліферації *in vitro* [148, 149]. Також показано, що CTNRC1 стимулює експресію bFGF в остеобластах через активацію сигналювання Wnt/ $\beta$ -катенін, причому можливі клітино-специфічні ролі bFGF і CTNRC1 у злоякісних пухлинах та клітинах кісток [150]. Також показано, що CTNRC1 сприяє інвазії пухлини за рахунок активації експресії MMP9 і MMP7 і що опосередковано шляхами AP-1/c-Jun та NF- $\kappa$ B [151].

Важливим регулятором проліферації і міграції клітин, а також міжклітинних взаємодій є FAT1 (FAT1 Atypical Cadherin 1), який ще називають гомологом 1 супресора пухлин FAT, оскільки він контролює вищі рівні регуляції про-запальних та онкогенних сигнальних шляхів [152]. Він характеризується наявністю великих позаклітинних доменів, які складаються з 34 мотивів кадгеринів, і є супресором пухлин. У гліальних пухлинах спостерігається знижений рівень експресії FAT1, що є важливим для підвищення активності HIF1 $\alpha$  за умов гіпоксії, а це, в свою чергу, впливає на метаболічну адаптацію та збільшує інвазивні властивості пухлинних клітин, що опосередковується EGFR / Akt / mTOR (синтетичної) і VHL (протеасомної деградації) [153, 154].

Відомо, що SFRP4 (Secreted frizzled related protein 4), який є членом родини SFRP і містить багатий на цистеїн домен і є модулятором сигналізації Wnt, посилює диференціювання преадипоцитів у жировій тканині людини з мезенхімальних стовбурових клітин, причому у вісцеральній та підшкірній жировій тканині спостерігається підвищений його рівень і це тісно пов'язано із резистентністю до інсуліну [155, 156]. Більше того, було показано, що SFRP4 інгібує сигналізацію WNT і знижує секрецію інсуліну шляхом пригнічення надходження кальцію та екзоцитозу інсуліну в  $\beta$ -острівці [157]. У зв'язку з цим, протеїн SFRP4 може бути невід'ємною частиною адипогенного процесу.

Було також встановлено, що в регулюванні ліпогенезу бере участь і TPD52 (Tumor protein D52), який індукується андрогенами за карциноми простати і є потужним регулятором ліпогенезу та ліпідного обміну за цього захворювання [158]. Надекспресія TPD52 призводить до активації проліферації клітин за рахунок посилення Akt / РКВ сигнального шляху при онкологічному процесі, крім того, може пригнічувати апоптоз через активацію шляху Stat3 / Bcl-2. Також, TPD52 причетний до регулювання міграції клітин і інвазії, інгібує репарацію пошкоджень ДНК [159].

Важливу роль у контролі процесів ожиріння та проліферації відіграє і аддуцин (ADD3; adducin), оскільки є важливим компонентом мембранного скелету на основі спектрину. [160]. Він належить до родини аддуцинів, які пов'язують

спектринові олігомери та актинові філаменти, стабілізуючи тим самим клітинні структури. Окрім того, аддуцини можуть взаємодіяти з актином цитоскелету незалежно від спектрину, зв'язуючи актинові філаменти. Всі аддуцини мають подібну молекулярну організацію, яка характеризується глобулярним головним доменом на N-кінці, доменом шиї і хвостовим доменом на C-кінці молекули. C-кінцевий хвіст опосередковує взаємодії з основними партнерами зв'язування, такими як актинові філаменти, спектрини і трансмембранні протеїни. Вони також містять висококонсервативні 22-залишкові MARCKS-взаємопов'язані мотиви з сайтами фосфорилування для PKA і PKC. Показано, що фосфорилування цих мотивів MARCKS порушує взаємодію між аддуцинами і актином, олігомерами спектрину [160]. Враховуючи, що численні сигнальні шляхи, які включають PKC, активуються під час прогресування пухлин, підвищений рівень фосфо-аддуцину, який опосередкований PKC, спостерігається і в злоякісних клітинах [161, 162].

Отже, жирова тканина діє як ендокринний орган через секрецію різних адипокінів і цитокінів та відіграє важливу роль у регуляції метаболічних шляхів. При розростанні жирової тканини надмірне зберігання вільних жирних кислот може призвести до її дисфункції, і як результат - запалення та збільшення секреції про-запальних цитокінів і надходження макрофагів, що призводить до розвитку резистентності до інсуліну в печінці та скелетних м'язах.

Підшкірна жирова тканина складає близько 80% всієї жирової тканини організму. Адипоцити підшкірної жирової тканини секретують більше таких адипокінів, як лептин й адипонектин, порівняно з вісцеральним жиром. Лептин є зв'язуючою ланкою між адипоцитами та клітинами підшлункової залози і стимулює секрецію інсуліну при зниженні чутливості до нього. Адипонектин зменшує секрецію адипоцитами інтерлекінів, хемотаксичного білка, тканинних інгібіторів протеїназ, які відіграють важливу роль у ремоделюванні позаклітинного матриксу жирової тканини та в адипогенезі. Жирова тканина відіграє важливу роль в енергетичному обміні в організмі, а також у регуляції практично всіх обмінних процесів. Важливе значення функціонування жирової тканини набуває при ожирінні, коли секреція паракринних/автокринних факторів патологічно змінена,

що може призвести до резистентності до інсуліну та дисліпідемії в рамках метаболічного синдрому.

Дослідженнями, проведеними на молекулярному та клітинному рівнях, встановлено, що за ожиріння відбувається функціональна перебудова геному, змінюється експресія великої кількості генів, причому не лише у жировій тканині, але й в інших органах і тканинах, зростає кількість адіпокінів, а також порушується рівень регуляторних мікроРНК. У зв'язку з цим, пізнання детальних молекулярних механізмів порушення процесів метаболізму на клітинному та системному рівнях буде сприяти вивченню як природи ожиріння, так і його метаболічних ускладнень, а також розробці нових стратегій профілактики та лікування цих захворювань.

## РОЗДІЛ 2.

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 2.1. Матеріали та умови проведення експерименту

Дослідження проводилися на підшкірній жировій тканині, яку було взято шляхом біопсії у трьох груп чоловіків віком біля 45 років (по шість осіб у кожній групі): 1) контрольна група худих чоловіків (індекс маси тіла  $23 \pm 0,6$ ), 2) група чоловіків з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози (індекс маси тіла  $32 \pm 0,6$ ) і 3) група чоловіків з ожирінням, що мали порушену толерантність до глюкози (індекс маси тіла  $34 \pm 0,6$ ). Клінічна характеристика пацієнтів і отримання біологічного матеріалу було проведено в Інституті експериментальної ендокринології Словацької академії наук з дотриманням всіх біотичних вимог і надано для проведення досліджень по вивченню експресії генів.

У табл.1 представлені дані про основні показники обстежених чоловіків: вік пацієнтів, індекс маси тіла, розмір талії, рівень глюкози в крові натщесерце та через 2 години після глюкозо-толерантного тесту, індекс чутливості до інсуліну, який свідчить про наявність резистентності до інсуліну, а також рівень тригліцеридів та інсуліну натщесерце. Здорові чоловіки без ознак ожиріння були основним контролем до груп обстежених пацієнтів з ожирінням. Окрім того, групу чоловіків з ожирінням і порушеною толерантністю до глюкози порівнювали з такою ж групою пацієнтів з ожирінням, але з нормальною толерантністю до глюкози.

Як видно із даних, наведених у табл. 1, група чоловіків з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози істотно не відрізнялася від контрольної групи за віком, рівнем глюкози, інсуліну та тригліцеридів натщесерце, причому за даними глюкозо-толерантного тесту вона характеризувалася відсутністю порушень толерантності до глюкози, але збільшеною масою тіла та зниженою чутливістю до інсуліну.

Таблиця 2.1.

Характеристика груп пацієнтів, підшкірна жирова тканина від яких була використана для проведення досліджень

Показники	Худі Чоловіки (контроль)	Чоловіки з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози	Чоловіки з ожирінням з порушеною толерантністю до глюкози
Вік пацієнтів (роки) (n)	44±3,4 (6)	45±3 (6)	44±3,2 (6)
Індекс маси тіла (ІМТ; ВМІ) (кг/м <sup>2</sup> )	23±0,6 (6)	32 ± 0,6 * (6)	34 ± 0,6 * (6)
Рівень глюкози натщесерце (ммоль/л) (n)	4,5 ± 0,19 (6)	5,0 ± 0,22 (6)	5,5 ± 0,26 (6)
Рівень глюкози (2 години глюкозо- толерантний тест; ммоль/л) (n)	5,5 ± 0,26 (6)	5,31 ± 0,88 (6)	7,83 ± 0,36 *^ (6)
Індекс чутливості до інсуліну (Г; мг/кг/хв) (n)	7,9 ± 0,58 (6)	5,1 ± 0,67 * (6)	2,7 ± 0,19 *^ (6)
Тригліцериди (ммоль/л) (n)	1,0 ± 0,19 (6)	1,36 ± 0,2 (6)	2,17 ± 0,44*^ (6)
Рівень інсуліну (μIU/мл) (n)	8,0 ± 2,8 (3)	9,37 ± 1,6 (3)	15,2± 2,3 * (4)
Розмір талії (см) (n)	86 ± 4,3 (5)	113 ± 3,3 * (6)	114 ± 3,4 * (6)

Примітка: дані представлені як  $M \pm m$ ; \* -  $P < 0,05$  у порівнянні з контролем;

^ -  $P < 0,05$  у порівнянні з ожирінням та нормальною толерантністю до глюкози;

У порівнянні з контрольною групою чоловіків, група пацієнтів із ожирінням і порушеною толерантності до глюкози, мала збільшену масу тіла, але ці дві групи

істотно не відрізнялися між собою за віком та рівнем глюкози натщесерце. В групі чоловіків з ожирінням і порушеною толерантністю до глюкози порівняно з групою контрольних чоловіків спостерігався підвищений рівень тригліцеридів та інсуліну, а також підвищений рівень глюкози після 2-х годинного глюкозо-толерантного тесту, що свідчило про наявність резистентності до інсуліну, за рахунок порушення толерантності до глюкози і що узгоджувалося зі зниженою чутливістю до інсуліну (Таблиця 1).

У порівнянні з контрольною групою, обидві групи чоловіків з ожирінням як із нормальною, так і порушеною толерантністю до глюкози мали збільшений розмір талії та підвищений індекс маси тіла, але за цим показником групи чоловіків з ожирінням між собою не відрізнялися, мали близькі показники як маси тіла, так і розміру талії.

У роботі використовували методи виділення РНК із тканин та клітин, спектрометричні методи визначення кількості РНК та ДНК, метод синтезу комплементарних ДНК, методи зворотної транскрипції та полімеразної ланцюгової реакції, комп'ютерний аналіз полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі, а також статистичні методи аналізу отриманих результатів.

## **2.2. Виділення РНК**

РНК із жирової тканини виділяли за допомогою спеціального набору реагентів («RNeasy Lipid Tissue Mini Kit» («QIAGEN», Німеччина) згідно протоколу виробника. «Міні-кіт RNeasy» для ліпідних тканин включав: реагент для лізису жирових тканин «QIAzol», колонки RNeasy для очищення до 100 мкг високоякісної РНК, реагенти і буферні розчини без домішок РНКаз.

Зразки жирової тканини 10-50 мг гомогенізували в 250 мкл реагенту для лізису клітин «QIAzol». Після додавання 50 мкл хлороформу, гомогенат поділився на дві фази (водну й органічну) після центрифугування протягом 10 хв при 15000 g і температурі 4°C. Верхню, водну фазу, відбирали й додавали 75% етанол для забезпечення відповідних умов зв'язування у співвідношенні 1:1. Потім зразок



наносили на колонку RNeasy spin, де загальна РНК зв'язувалася з мембраною, а фенол та інші забруднювачі ефективно видалялися. Високоякісну РНК елюювали в 30-50 мкл H<sub>2</sub>O dist, вільної від РНКаз. Концентрацію виділеної РНК вимірювали на безкюветному спектрофотометрі NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, США). Вимірювали також співвідношення поглинання зразків РНК при 260 та 280 нм для оцінки їх чистоти.

### **2.3. Синтез комплементарних ДНК методом зворотної транскрипції мРНК та ампліфікація комплементарних ДНК методом полімеразної ланцюгової реакції**

Експресію мРНК різних ангиогенних факторів, всіх ростових, а також багатьох інших генів досліджували методами зворотної транскрипції та полімеразної ланцюгової реакції [163, Auf tet al, 2013]. Принцип методу зворотної транскрипції полягає у синтезі ДНК-копії (кДНК або комплементарної ДНК) з відповідних мРНК за допомогою оліго(dT)-праймера та зворотної транскриптази. За допомогою прямого та зворотного праймера, які є специфічними до необхідної ділянки кДНК та Taq-полімерази проводили ампліфікацію ділянки кДНК. За допомогою електрофорезу в агарозному гелі аналізували продукти ампліфікації.

Набір „QuantiTect Reverse Transcription” («QIAGEN», Німеччина) й тотальну РНК із підшкірної жирової тканини як матрицю використовували для синтезу комплементарної ДНК, в якому передбачено етап, що забезпечує елімінацію можливих залишків геномної ДНК. Для цього 1 мкг РНК спочатку короткочасно (протягом 2 хв) інкубували з буфером «gDNA Wipeout» в об'ємі 14 мкл, охолоджували на льоду, а потім інкубували з «Quantiscript» зворотною транскриптазою у присутності буферу та суміші праймерів «(Primers mix)», що уже містив інгібітор рибонуклеаз і набір чотирьох дезоксирибонуклеотидів при 45° протягом 15 хв. Реакцію зупиняли прогріванням реакційної суміші при 95°C протягом 3 хв, проби швидко охолоджували і отриману таким чином кДНК використовували для дослідження експресії генів.

## 2.4. Зворотна транскрипція мікроРНК

Виділення мікроРНК з тотальної РНК відбувається за допомогою полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі (qRT-PCR), і складається з наступних етапів:

1. Поліаденілювання мікроРНК за допомогою поліА-полімерази, з використанням спеціалізованого набору для визначення мікроРНК «NCode™ miRNA First-Strand cDNA Synthesis».

Ґрунтуючись на кількості загальної РНК, ми розводили наявний у наборі розчин 10 мМ АТР в 1 мМ Тріс (рН 8,0) у 50 разів (1 : 49) додаванням до 1 мкл 10 мМ АТР 49 мкл 1 мМ Тріс. Потім АТР вносили у пробірку з аліквотою загальної РНК, додавали концентрований в 5 разів miRNA-реакційний буферний розчин, 25 мМ хлорид марганцю та 0,5 мкл поліА-полімерази А. Об'єм реакційної суміші доводили до 25 мкл за допомогою DEPC-обробленої Н<sub>2</sub>О. Після цього центрифугували (1000 об/хв). Потім пробірки інкубували протягом 15 хв в термостаті при 37 ° С.

2. Синтез комплементарної ДНК (cDNA First-Strand). На цьому етапі проводили зворотну транскрипцію поліаденільованої miRNA для отримання кДНК. Для цього у мікроцентрифужну пробірку, вільну від РНКаз вносили: 1) 4 мкл поліаденільованої РНК, 2) 1 мкл реакційного буферного розчину та 3) 3 мкл універсального зворотного праймера (RT Primer; 25 мкМ). Далі проводили інкубацію пробірок при 65°C протягом 5 хв і переносили їх на лід, витримували протягом 1 хв. Після цього додали в пробірку 10 мкл концентрованої в 2 рази First-Strand первинної реакційної суміші, 2 мкл зворотної транскриптази («SuperScript® III RT / RNaseOUT™ Enzyme Mix»). Потім центрифугували і інкубували протягом 50 хв при 50°C. Після чого пробірки прогрівали при 85°C протягом 5 хв для зупинки реакції і охолоджували на льоду.

3. Далі кДНК була використана для визначення мікроРНК у qPCR аналізі з використанням двох праймерів: універсального, який поставляється з кожним набором, і прямого праймера, який є специфічним для кожної мікроРНК.

Для вивчення експресії мікроРНК miR-21 був використаний наступний праймер: 5' - TAGCTTATCAGACTGATGTTGA - 3';

Для визначення експресії мікроРНК miR-143 був використаний наступний праймер: 5' - TGAGATGAAGCACTGTAGCTC - 3';

Для вивчення експресії мікроРНК miR-145 був використаний наступний праймер: 5' - GTCCAGTTTTCCCAGGAATCCCT - 3';

Для визначення експресії мікроРНК miR-190 був використаний наступний праймер: 5' - TGATATGTTTGATATTGGGTT - 3';

Для вивчення експресії мікроРНК miR-19a був використаний наступний праймер: 5' - TGTGCAAATCCATGCAAAACTGA - 3'

Для визначення експресії мікроРНК miR-7bb був використаний наступний праймер: 5' - TGGAAGACTAGTGATTTTGTGT - 3'.

## **2.5. Вивчення експресії мРНК методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі**

Експресію генів *FAT1*, *PPDPF*, *SFRP4*, *CTHRC1*, *EGFL6*, *DUSP1*, *DUSP4*, *DUSP6*, *DUSP22*, *PTEN*, *PDFGC*, *FGF1*, *FGF2*, *FGFR2*, *FGFRL1*, *VEGF-A*, *E2F8*, *HIF1A*, *EPAS1*, *CTGF*, *MYLK*, *MEST*, *PLAT*, *PLAU*, *PLAUR*, *SERPINE1*, *CLEC3B*, *TPD52*, *ITGB1*, *ITGAM*, *TLR4*, *TLR2*, *TNF*, *ADD3*, *ADM*, а також бета-актину (*ACTB*) досліджували методами зворотної транскрипції та полімеразної ланцюгової реакції (у реальному часі), яку проводили на апараті «The 7900 HT Fast Real-Time PCR System» і «QuantStudio 5 Real-Time PCR System» («Applied Biosystems»), використовуючи для проведення реакції набір «Absolute QPCR SYBRGreen Mix» («Thermo Fisher Scientific», США) та пари праймерів, специфічних для кожного гена, що були отримані із компанії «Sigma-Aldrich» (США).

Для вивчення експресії гена *FAT1* (FAT Atypical Cadherin 1), відомого ще як FAT tumor suppressor homolog 1, були використані такі праймери: прямий 5'-ATCGTGAGGAGCAAGCTGTT -3' і зворотний 5'-CTGCCTGGAGTTCTCTGTCC-3', які відповідали нуклеотидним послідовностям 9445 – 9464 та 9768 – 9749 кДНК

FAT1 людини (GenBank номер NM\_005245); розмір ампліфікованого фрагмента 324 пар нуклеотидних залишків (п.н.з.).

Для гена *PPDPF* (pancreatic progenitor cell differentiation and proliferation factor) кДНК - 5'- GTCCTGACCTGAGCGGTTAC-3' прямий і 5'- AGGAAAGCTAGCGAGTGCTG - 3' зворотний, які відповідали нуклеотидним послідовностям 479 – 4998 та 713-694 кДНК *PPDPF* людини (GenBank номер NM\_024299); розмір ампліфікованого фрагмента 235 п.н.з.

Для ампліфікації *SFRP4* (Secreted Frizzled-Related Protein 4) кДНК ми використовували прямий 5'-CTGCCCCATCAAGATGTTCT-3' та зворотний 5'-CGGCTGTTTTCTTCTTGTCC-3' праймери з послідовністю 1131 – 1150 та 1302 – 1283 кДНК *SFRP4* людини (GenBank номер NM\_003014, а довжина фрагмента ампліфікації – 172 п.н.з.

Для ампліфікації *CTHRC1* людини (Collagen Triple Helix Repeat Containing 1) кДНК ми використовували прямий 5' - GCTCACTTCGGCTAAAATGC- 3' та зворотний 5'- GAACAAGTGCCAACCCAGAT - 3' праймери з послідовністю 527 – 546 та 755 – 736 в кДНК *CTHRC1* людини (GenBank номер NM\_138455); а довжина ампліфікованого фрагмента 229 п.н.з.

Ампліфікацію кДНК *EGFL6* (Epidermal Growth Factor [EGF]-Like-domain multiple 6) кДНК проводили з праймерами 5' - CCTGATTCTGGTCCAAAGGA - 3' - прямий та 5' - GCCAGGGCATTTGTTACTGTT - 3' - зворотній, що відповідали нуклеотидним послідовностям 1421 – 1440 та 1759 – 1740 кДНК *EGFL6* (GenBank номер NM\_015507); довжина фрагмента – 339 п.н.з.

Для ампліфікації *DUSP1* (Dual specificity phosphatase 1), відомої ще як МКР2 (Mitogen-activated protein kinase phosphatase 2), кДНК проводили з праймерами: прямий - 5' - CTGCCTTGATCAACGTCTCA - 3' та зворотній - 5'- ACCСТТССТССAGCATТСТТ - 3', які відповідали нуклеотидним послідовностям 850 – 869 і 1009 – 990 кДНК *DUSP1* людини (GenBank NM\_004417); розмір ампліфікованого фрагмента 160 п.н.з.

Для ампліфікації *DUSP2* (Dual specificity phosphatase 4), також відомої як МКР2 (Mitogen-activated protein kinase phosphatase 2), кДНК ми використовували

прямий - 5' - AGGCGGCTATGAGAGGTTTT - 3' та зворотній - 5' - CACTGCCGAGGTAGAGGAAG - 3', які відповідали нуклеотидним послідовностям 904 – 923 і 1094 – 1075 кДНК людини (GenBank номер NM\_005923); розмір ампліфікованого фрагмента 191 п.н.з.

Для ампліфікації *DUSP6* (Dual specificity phosphatase 6), відомої також як МКР3 (Mitogen-activated protein kinase phosphatase 3) кДНК ми використовували прямий - 5' - CCGGCTTTACTTCTGTCTCG- 3' та зворотній - 5' - TGTGCGACGACTCGTATAGC - 3', які відповідали нуклеотидним послідовностям 310-329 і 628-609 кДНК *DUSP6* (GenBank номер NM\_001946); розмір ампліфікованого фрагмента 319.

Для ампліфікації *DUSP22* (Dual specificity phosphatase 22), також відомої як МКРХ (Mitogen-activated protein kinase phosphatase X) та JNK-stimulatory phosphatase-1 (JSP1), кДНК ми використали прямий 5' - TCCTCCTCCCTGТААСАТGC - 3' та зворотній 5' - GCTGGGATGCACAGGTATTT - 3', які відповідали нуклеотидним послідовностям 366-385 та 603-584 кДНК *DUSP22* людини (GenBank номер NM\_020185); розмір ампліфікованого фрагмента 238 п.н.з.

Для ампліфікації *PTEN* (Phosphatase and tensin homolog), відомого ще як dual-specificity protein phosphatase I phosphatidylinositol 3,4,5 – triphosphate 3-phosphatase PTEN, кДНК були підібрані наступні праймери: прямий - 5' - ACCAGGACCAGAGGAAACCT - 3' та зворотній 5' - GCTAGCCTCTGGATTTGACG - 3', які відповідали нуклеотидним послідовностям 1871-1890 і 2111-2092 кДНК *PTEN* людини (GenBank номер NM\_000314); розмір ампліфікованого фрагмента 241 п.н.з.

Для гена *CTGF* (Connective tissue growth factor), відомого також як IGFBP8 (Insulin-like growth factor-binding protein 8), кДНК були підібрані наступні праймери: прямий 5' - АСТGТСССGGAGAGСААТGАС - 3' і зворотній 5' - TGCTCCTAAAGCCACACCTT - 3', які відповідали нуклеотидним послідовностям 1189-1208 і 1527-1508 кДНК *CTGF* людини (GenBank NM\_001901); розмір ампліфікованого фрагмента 339 п.н.з.

Для вивчення рівня експресії *MYLK* (Myosin light polypeptide kinase) кДНК були застосовані такі праймери: прямий 5' - CCCGTGCTAGGAACTGAGAG - 3' та зворотній 5' - TTCTCGCTGTTCTCCACSTT - 3', які відповідали нуклеотидним послідовностям 1249 – 1268 і 1487 – 1468 кДНК *MYLK* людини (GenBank номер NM\_005965); розмір ампліфікованого фрагмента 239 п.н.з.

Для вивчення експресії гена *MEST* (Mesoderm specific transcript) були використані такі праймери: прямий 5' - TTGGCTTCAGTGACAAACCG - 3' та зворотній 5' - TGACAGCACACSTCCATCTT - 3', які відповідали нуклеотидним послідовностям 576 – 595 й 859 – 840 кДНК *MEST* людини (GenBank номер NM\_002402); розмір ампліфікованого фрагмента 284 п.н.з.

Для гена *TPD52* (Tumor protein D52) також відомий як PrLZ (Prostate leucine zipper) підібрані наступні праймери: прямий - 5' - TGTTGGCTCACTCATCASSA - 3' та зворотній 5' - TTTTCTGGAAGAGGCTCCGT - 3', які відповідали нуклеотидним послідовностям 506 – 515 та 694 – 675 кДНК *TPD52* людини (GenBank номер NM\_005079); розмір ампліфікованого фрагмента 189 п.н.з.

Для гена *PLAUR* (Plasminogen activator, urokinase receptor) були підібрані наступні праймери: прямий - 5' - GCCTTACCGAGGTTGTGTGT - 3' та зворотній 5' - TGTTGCAGCATTTCAGGAAG - 3', які відповідали нуклеотидним послідовностям 486 – 505 і 809 – 790 кДНК *PLAUR* людини (GenBank номер NM\_002659); розмір ампліфікованого фрагмента 324 п.н.з.

Для ампліфікації *PLAU* (активатор плазміногену урокіназного типу) ми використали прямий 5' - TCACCACCAAAATGCTGTGT - 3' та зворотній 5' - AGGCCATTCTCTTCCSTTGGT - 3' праймери з послідовністю 1210 – 1229 та 1432 – 1413 в кДНК *PLAU* людини (GenBank номер NM\_002658), а довжина фрагмента ампліфікації 223 п.н.з.

Дослідження експресії гена *PLAT* (Тканинний активатор плазміногену) проводили використовуючи таку пару праймерів: прямий – 5' – TGTTGCAGCATTTCAGGAAG - 3' та зворотній - 5'- CAGCAGGCCSTGТАCTTCTC - 3', які відповідали нуклеотидним послідовностям

501 – 520 та 772 – 753 кДНК PLAT людини (GenBank номер NM\_000930). Довжина фрагмента ампліфікації 272 п.н.з.

Для вивчення рівня експресії гена *SERPINE1* (Інгібітор пептидази серпіну, відомий також як інгібітор активатора плазміногену типу 1) були використані такі праймери: прямий - 5' - GGCTTTGAGTCTCGATCTGG - 3' та зворотній 5'-CTCTCTCTGCCSTCASSAAC - 3', які відповідали нуклеотидним послідовностям 954 – 973 та 1165 – 1146 кДНК *SERPINE1* людини (GenBank номер NM\_00602). Довжина фрагмента ампліфікації 212 п.н.з.

Вивчення рівня експресії гена *CLEC3B* (C-type lectin domain family 3, member B), який відомий ще як tetranectin та plasminogen BP, проводили за допомогою таких праймерів: прямого - 5'- ACCCAGAAGCCCAAGAAGAT - 3' та зворотного 5'-GAAGGTCTTCGTCTGGGTGA - 3', які відповідали нуклеотидним послідовностям 169 – 188 та 369 – 350 кДНК *CLEC3B* людини (GenBank номер NM\_003278). Довжина фрагмента ампліфікації 201 п.н.з.

Для вивчення рівня експресії гена *ITGB1* (Інтегрин, бета 1 чи антиген CD29) були використані такі праймери: 5'- AGAAGCTTTGTAGCCGGTGA - 3' та зворотній 5'- CGAGGTCATGGTTCATGTTG - 3', які відповідали нуклеотидним послідовностям 2354 – 2373 та 2593 – 2574 кДНК *ITGB1* людини (GenBank номер NM\_002211). Довжина фрагмента ампліфікації 240 п.н.з.

Вивчення рівня експресії гена *ITCAM* (Інтегрин, альфа М) проводили за допомогою таких праймерів: прямого - 5'- CAGTGTGTGGGATTTGCAC - 3' та зворотного 5'- ATCTCAAATTCACGGCCTCA - 3', які відповідали нуклеотидним послідовностям 2911 – 2930 та 3204 – 3185 кДНК *ITCAM* людини (GenBank номер \_000632). Довжина фрагмента ампліфікації 293 п.н.з.

Для вивчення рівня експресії гена *VEGF-A* (Ендотеліальний фактор росту судин) були використані такі праймери: прямий 5' - CGAAACCATGAACTTTCTGC - 3' і зворотній 5' - CCTCAGTGGGCACACACTCC - 3', які відповідали нуклеотидним послідовностям 1032 – 1051 та 1333 – 1314 кДНК *VEGF-A* людини (GenBank номер NM\_003376); розмір ампліфікованого фрагмента 302 п.н.з.

Для гена *VEGF-A-189* (Сплайс-варіант 189 ендотеліального фактора росту судин) були використані такі праймери: прямий - 5' - CCCACTGAGGAGTCCAACAT - 3' та зворотній 5' - TTTCTTGCGCTTTCGTTTTT - 3', які відповідали нуклеотидним послідовностям 1317 – 1336 та 1502 – 1483 кДНК *VEGF-A-189* людини (GenBank номер NM\_003376); розмір ампліфікованого фрагмента 186 п.н.з.

Для ампліфікації *E2F8* (E2F транскрипційний фактор 8) кДНК ми використали прямий 5' - CCACCACAGCAAATATCGTF - 3' та зворотній 5' - STTTGGCCTCAGGTAATCCA - 3' праймери з послідовністю 596 – 615 та 805 – 786 кДНК *E2F8* людини (GenBank номер NM\_024680), а довжина фрагмента ампліфікації 210 п.н.з.

Ампліфікацію кДНК *EPAS1* (Ендотеліальний PAS доменний протеїн 1), також відомий як фактор, який індукується гіпоксією 2 альфа (HIF-2 $\alpha$ ), проводили з праймерами 5' - AAGCSTTGGAGGGTTTCATT - 3' - прямий та 5' - TCATGAAGAAGTCCCGCTCT - 3' - зворотній, що відповідали нуклеотидним послідовностям 788 – 807 та 1021 – 1002 кДНК *EPAS1* людини (GenBank номер NM\_001430), а довжина фрагмента 234 п.н.з.

Для дослідження експресії гена *FGF1* (Фактор росту фібробластів 1) були використані такі праймери: прямий - 5' - CTGCAGTAGCCTGGAGGTTTC - 3' і зворотній - 5' - GGCTGTGAAGGTGGTGATTT - 3', послідовність яких відповідала нуклеотидним залишкам 3 – 22 і 199 – 180 кДНК *FGF1* людини (GenBank номер NM\_000800), а довжина фрагмента ампліфікації – 198 п.н.з.

Для вивчення рівня експресії гена *FGF2* (Фактор росту фібробластів 2) була використана така пара праймерів: 5' - AGAGCGACCCTCACATCAAG - 3' і 5' - АСТGCCСAGTTСGTTTCAGT - 3', які відповідали нуклеотидним послідовностям 571 – 590 та 804 – 785 кДНК *FGF2* людини (GenBank номер NM\_002006). Довжина фрагмента ампліфікації – 234 п.н.з.

Для дослідження експресії гена *FGFR2* (Рецептор фактора росту фібробластів 2) були використані такі праймери: прямий - 5' - GTGCTTGGCGGGTAATTСТА - 3' і зворотній 5' - TACGTTTGGTCAGCTTGTGC - 3', які відповідали нуклеотидним



послідовностям 1325 – 1344 та 1566 – 1547 кДНК FGFR2 людини (GenBank номер NM\_001144918); довжина фрагмента ампліфікації – 242 п.н.з.

Для ампліфікації кДНК *FGFRL1* (Рецепторно-подібний фактор росту фібробластів 1) були підібрані: прямий праймер - 5' - CAGCCTGAGCGTCAACTACA - 3' і зворотний праймер - 5' - CTCATCTTGGAGGGCTGTGT - 3', які відповідали нуклеотидним послідовностям 340 – 359 й 489 – 470 кДНК FGFRL1 людини (GenBank номер NM\_021923); довжина фрагмента ампліфікації – 150 п.н.з.

Для вивчення рівня експресії *PDGF-C* (Тромбоцитарний фактор росту - C), також відомий як VEGFE (Ендотеліальний фактор судин E) були використані такі праймери: прямий - 5' - CTCCTGGTTAAACGCTGTGG - 3' і зворотний - 5' - TATCCTCCTGTGCTCCCTCT - 3', які відповідали нуклеотидним послідовностям 1314 – 1333 і 1528 – 1509 кДНК PDGF-C людини (GenBank номер NM\_016205). Довжина фрагмента ампліфікації – 215 п.н.з.

Для дослідження експресії гена *CYR61* (Багатий цистеїном ангиогенний індуктор 61), також відомий як протеїн, що зв'язує інсуліно-подібні фактори росту, були використані наступні праймери: прямий - 5' - CTCCTGTTTTTGGAAATGGA - 3' і зворотній - 5' - TGGTCTTGCTGCATTTCTTG - 3', які відповідали нуклеотидним послідовностям 852 – 871 і 1092 – 1073 кДНК CYR61 людини (GenBank номер NM\_001554). Довжина фрагмента ампліфікації – 241 п.н.з.

Для ампліфікації кДНК *HIF1 $\alpha$*  (Фактор, який індукується гіпоксією 1 альфа) були використані такі праймери: прямий - 5' - GAAAGCGCAAGTCCTCAAAG - 3' та зворотній 5' - TGGGTAGGAGATGGAGATGC - 3', які відповідали нуклеотидним послідовностям 2175 – 2194 і 2341 – 2322 кДНК HIF1 $\alpha$  людини (GenBank номер NM\_001530). Довжина фрагмента ампліфікації – 167 п.н.з.

Для дослідження експресії гена *TLR2* (Toll like receptor 2) були використані такі праймери: прямий - 5' - GGGTTGAAGCACTGGACAAT - 3' та зворотній 5' - TCCTGTTGTTGGACAGGTCA - 3', які відповідали нуклеотидним послідовностям 202 – 221 і 409 – 390 кДНК TLR2 людини (GenBank NM\_003264). Довжина фрагмента ампліфікації 208 п.н.з.

Дослідження експресії мРНК *TLR4* (Toll like receptor 4) проводили з такими праймерами: прямий - 5' - TGAGCAGTCGTGCTGGTATC - 3' та зворотній - 5' - CAGGGCTTTTCTGAGTCGTC - 3', які відповідали нуклеотидним послідовностям 2570 – 2589 і 2736 – 2717 кДНК *TLR4* людини (GenBank номер NM\_138554). Довжина фрагмента ампліфікації 167 п.н.з.

Для дослідження експресії гена *ADD3* (Adducin 3) були використані такі праймери: прямий - 5' - TGGAGCAGAGGAAACGAGTT - 3' та зворотній - 5' - GTGTGCCCATCCAAACAAGT - 3', які відповідали нуклеотидним послідовностям 531 – 550 і 841 – 822 кДНК *ADD3* людини (GenBank номер NM\_001121). Довжина фрагмента ампліфікації 311 п.н.з.

Для дослідження експресії гена *ADM* (Adrenomedullin) були використані такі праймери: прямий - 5' - AGTGGGACGTCTGAGACTTT -3' і зворотній 5'-CCACAGAAAGCCAAACCTCC -3', які відповідали нуклеотидним послідовностям 80 – 99 і 280 – 261 кДНК *ADM* людини (GenBank номер NM\_001124). Довжина фрагмента ампліфікації – 201 п.н.з.

Відносну кількість транскриптів досліджених генів нормалізували по рівню експресії бета-актину (*ACTB*), для ампліфікації якого використовували наступні праймери: прямий - 5'- GGACTTCGAGCAAGAGATGG -3' та зворотний - 5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG -3', що починаються із 747-го (5'-позиція) та 980-го (3'-позиція) нуклеотидних залишків, відповідно; GenBank номер NM\_001101; довжина фрагмента ампліфікації бета-актину – 234 п.н.з.).

## **2.6. Електрофорез ампліфікованих фрагментів ДНК в агарозному гелі.**

У процесі ПЛР синтезуються фрагменти кДНК, які при електрофорезі в агарозному гелі дають смуги, що відповідають непередбачуваним розмірам продуктів ампліфікації цих генів.

Електрофоретичне дослідження ампліфікованих фрагментів кДНК проводили у 2% агарозному гелі у Тріс-ацетатному буфері з ТАЕ (0,14 М Tris-HCl; 20 мМ оцтова кислота, 2 мМ ЕДТА (рН 8,0)) шляхом нагрівання до 100°C. Потім цей розчин охолоджували спочатку до 50°C, після цього вносили у форму для

електрофоретичної камери. Електрофорез проводили в буфері TAE при напрузі 10 вольт/см протягом 60 хвилин і ДНК візуалізували за допомогою етидію броміду.

кДНК фарбували спеціальним буфером для нанесення. У кожен лунку вносили по 5 – 10 мкл зразка, а в окрему лунку – 5 мкл маркеру молекулярної ваги для ДНК (GeneRuler 100-bp DNA ladder, Thermo Fisher Scientific, США). Електрофоретичний аналіз проводили в буфері TAE при градієнті напруги 10 В/см протягом 1 години. Після закінчення електрофорезу, гель інкубували спеціальним флуоресцентним барвником і детектували на цифровій фотокамері 168P (Mintron, Тайвань) в ультрафіолетовому світлі при довжині хвилі 310 нм.

Електрофоретичне дослідження ампліфікованих фрагментів підтвердило відсутність неспецифічних продуктів ПЛР.

## 2.7. Біоінформаційний аналіз сайтів зв'язування мікроРНК з мРНК

Оскільки в регуляції експресії генів важливу роль відіграють мікроРНК, то нами був проведений аналіз послідовностей досліджених мРНК на наявність в їх 3'-структурах сайтів зв'язування для мікроРНК miR-7b, miR-19a, miR-21, miR-143, miR-145 та miR-190 в програмі "TargetScanHuman, Prediction of microRNA targets" ([http://www.targetscan.org/vert\\_50](http://www.targetscan.org/vert_50)).

## 2.8. Статистична обробка результатів

Аналіз результатів кількісної (у реальному часі) полімеразної ланцюгової реакції проводили за допомогою спеціальної комп'ютерної програми „Differential expression calculator”. Рівні експресії (PE) досліджуваних генів розраховували за формулою (відносний порівняльний метод):

$PE = E\Delta C(t)$  контрольного гена -  $\Delta C(t)$  досліджуваного гена, де

$E$  – ефективність кількісної ПЛР у реальному часі з використаною парою праймерів;  
 $\Delta C(t)$  контрольного гена =  $C(t)$  за експериментальних умов -  $C(t)$  за контрольних умов;

$\Delta C(t)$  досліджуваного гена =  $C(t)$  за експериментальних умов -  $C(t)$  за контрольних умов.

Статистичний аналіз проводили із використанням програми Microsoft Excel, Origin 7.0. Результати виражали як  $M \pm m$ , де  $M$  – середнє значення, а  $m$  – середня квадратична похибка. Для порівняння двох вибірок спочатку перевіряли їх на нормальність розподілу за  $W$ -критерієм Шапіро-Вілка. Показник статистичної достовірності відмінностей  $P$  обчислювали за критерієм Стьюдента, використовуючи двовибірковий  $t$ -тест для середнього. Різницю між двома середніми величинами вважали достовірною при значенні  $P \leq 0.05$  [164]. Для кореляційного аналізу використовували тест Пірсона.

### **РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ**

### **3.1. Експресія генів, що кодують ангіогенні фактори, у підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням і нормальною та порушеною толерантністю до глюкози.**

Останнє десятиліття ожиріння набирає форми пандемії. Існують докази того, що розростання жирової тканини призводить до росту судинної мережі і цей процес індукується гіпоксією на первинному етапі. Згідно літературних даних, ожиріння у резистентних до інсуліну осіб проявляє зменшену експресію ангіогенних генів, а також зменшує капілярну щільність і кровотік у підшкірній жировій тканині, парціальний тиск  $O_2$  не змінюється, що можна пояснити зниженою швидкістю метаболізму жирової тканини за ожиріння у людей, хоча існує думка, що ріст жирової тканини пов'язаний з недостатньою ангіогенною реакцією на гіпоксію [165]. Ці спостереження вимагають кращого розуміння значення судинної мережі при розростанні жирової тканини. Саме тому було важливим дослідити рівень експресії різних ангіогенних факторів у підшкірній жировій тканині за умов ожиріння та його ускладнень.

Рівень експресії генів основних ангіогенних факторів визначали у жировій тканині трьох груп близьких за віком чоловіків: 1-ша – без ознак ожиріння (контроль; індекс маси тіла  $23 \pm 0,6$ ), 2-га – з ожирінням та нормальною толерантністю до глюкози (індекс маси тіла  $32 \pm 0,6$ ) та 3-тя – з ожирінням та порушеною толерантністю до глюкози (індекс маси тіла  $34 \pm 0,6$ ) (табл. 2.1).

Для дослідження впливу ожиріння на рівень експресії гена *VEGF-A*, який є потужним ангіогенним фактором, ми використовували два набори праймерів: одна пара для всіх альтернативних сплайс-варіантів цієї мРНК, а інша пара – специфічні лише для *VEGF-A-189*. Рис. 3.1. демонструє, що рівень експресії мРНК *VEGF-A* знижується (на 39%) у підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням й нормальною толерантністю до глюкози порівняно з контролем. Рівень експресії мРНК *VEGF-A-189* також на 49 % знижується у цій групі чоловіків з ожирінням. У той час, рівень експресії мРНК *VEGF-A* збільшується на 34 % у чоловіків з ожирінням, ускладненим порушеною толерантністю до глюкози, порівняно з

групою осіб з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози, але залишається зниженим порівняно зі значеннями в контрольній групі.

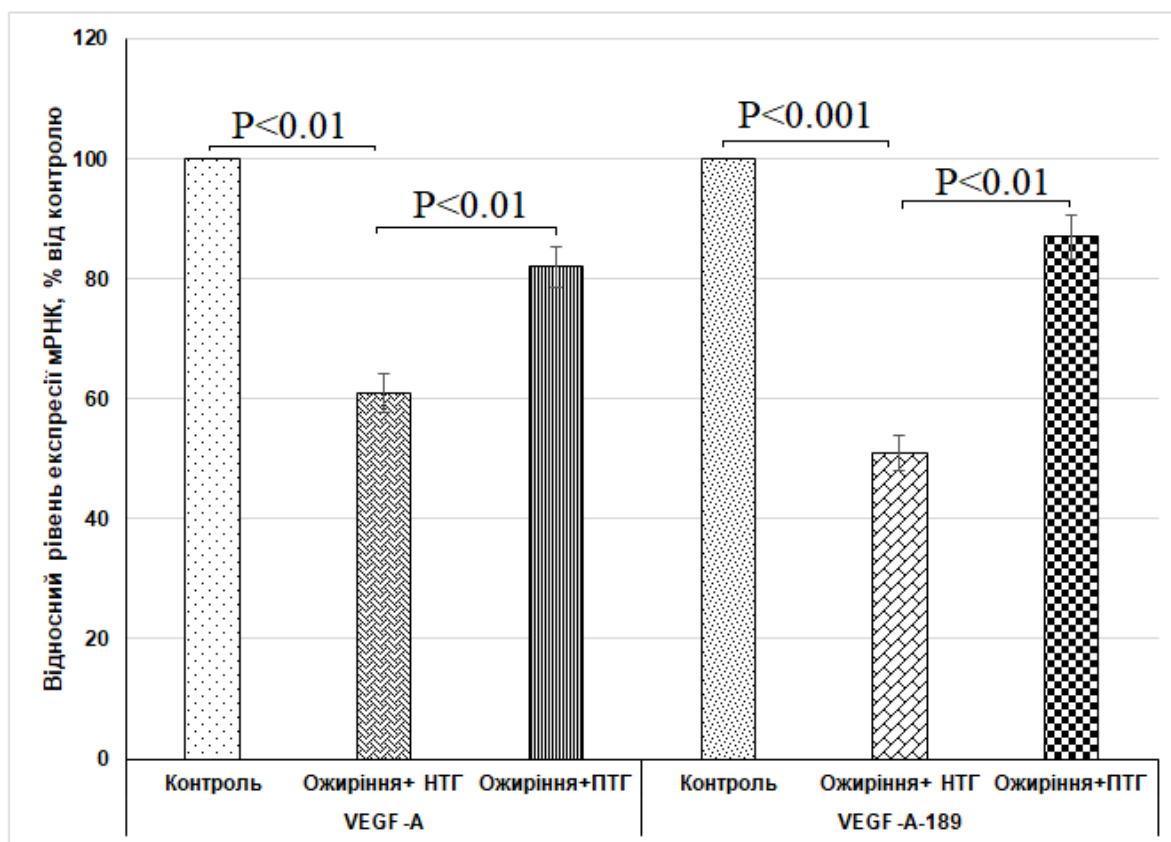


Рис. 3.1. Відносний рівень експресії *VEGF-A* та його альтернативного сплайс-варіанту *VEGF-A-189* мРНК у підшкірній жировій тканині чоловіків без ознак ожиріння (Контроль), а також осіб з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози (Ожиріння+НТГ) та ожирінням, ускладненим порушеною толерантністю до глюкози (Ожиріння+ПТГ).

*Примітки:* величину експресії генів *VEGF-A* та *VEGF-A-189* нормалізували по експресії бета-актину, причому рівень експресії всіх досліджених генів у контролі був прийнятим за 100%; n = 6.

Більш виражені зміни спостерігаються для сплайс-варіанту *VEGF-A-189*. Є дані, що дефіцит інсуліну призводить до VEGF-резистентності. Отже, збільшений на 71 % рівень експресії *VEGF-A-189* за резистентності до інсуліну може бути пов'язаний саме з цим.

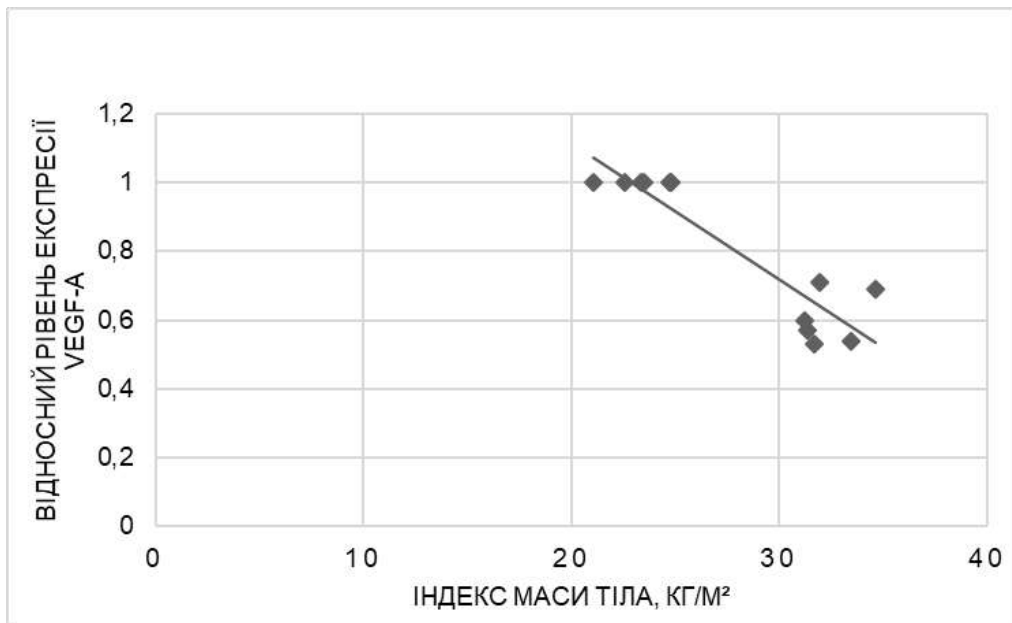
Проведеними дослідженнями також встановлено, що між зміною експресії генів *VEGF-A* і *VEGF-A-189* у підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози та індексом маси тіла є чітка негативна кореляція:  $r = -0,91935$  і  $r = -0,96744$ , відповідно (рис.3.2.).

На рис. 3.3. продемонстровано, що ожиріння впливає на експресію двох різних генів фактора росту фібробластів у підшкірній жировій тканині у протилежних напрямках: індукує на 135% експресію гена *FGF1* і знижує на 36% рівень експресії гена *FGF2*. В той же час, у підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням, ускладненим порушеною толерантністю до глюкози підвищується рівень експресії гена *FGF1* на 27 % і рівень експресії гена *FGF2* на 67 %. Після цього ми перевірили, як ці зміни у експресії генів *FGF1* та *FGF2* корелювали з експресією їхніх рецепторів: *FGFR2* і *FGFRL1*.

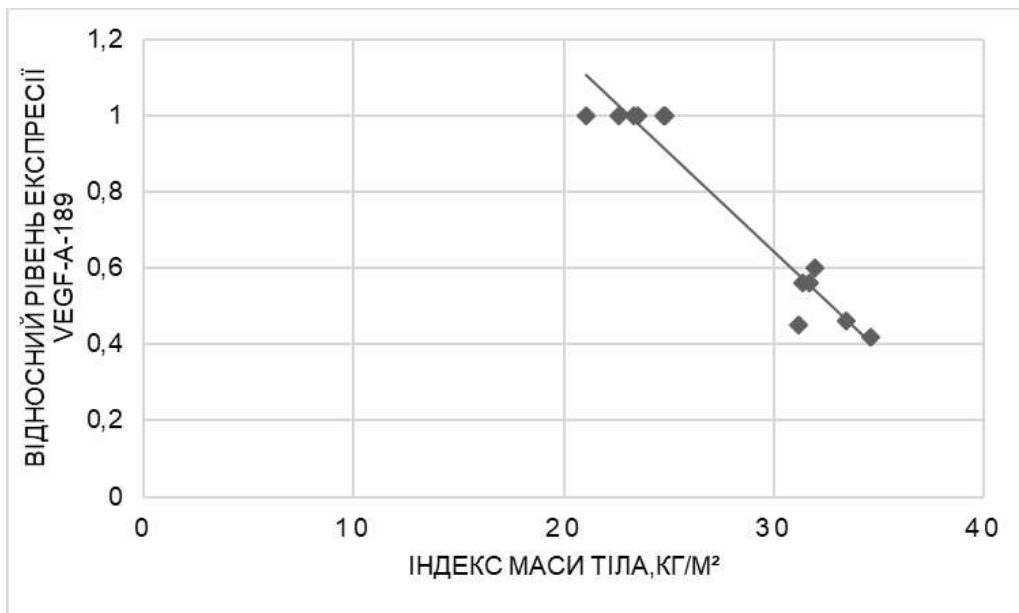
Виявлені зміни в експресії генів *FGF1* та *FGF2* у групи чоловіків з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози чітко корелювали з індексом маси тіла:  $r = 0,825585$ ;  $r = -0,87304$  (рис. 3.4).

Важливо відзначити, що експресія *FGFR2*, який переважно взаємодіє як з *FGF1*, так і *FGF2*, відповідальний за ангиогенез, підвищується на 61% у чоловіків з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози, порівняно з контролем, що показано на рис. 3.5. Більш того, ожиріння, ускладненого толерантністю до глюкози знижує на 20% рівень експресії мРНК *FGFR2* порівняно з групою чоловіків з ожирінням та нормальною толерантністю до глюкози.

У той же час, експресія гена *FGFRL1*, іншого члена родини *FGFR*, знижується на 50% у чоловіків з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози порівняно з контролем. Ці результати корелюють з його біологічною функцією як потенційного регулятора *FGF* сигналізації, бо *FGFRL1* не має тирозинкіназної активності. Більш того, порушена толерантність до глюкози не впливає на рівень експресії мРНК *FGFRL1*.



А



Б

Рис. 3.2. Кореляційна залежність між зміною експресії генів *VEGF-A* (А) та *VEGF-A-189* (Б) у підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози та індексом маси тіла.



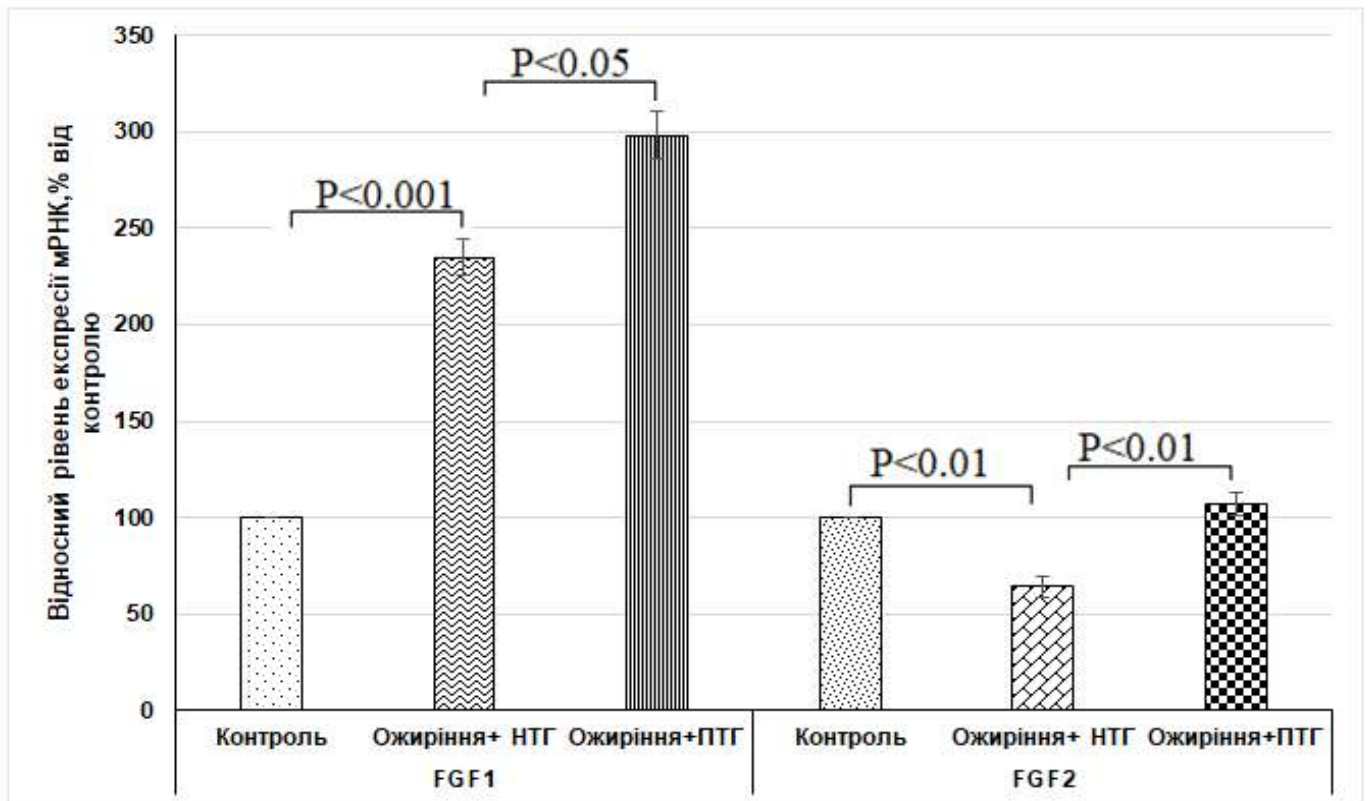
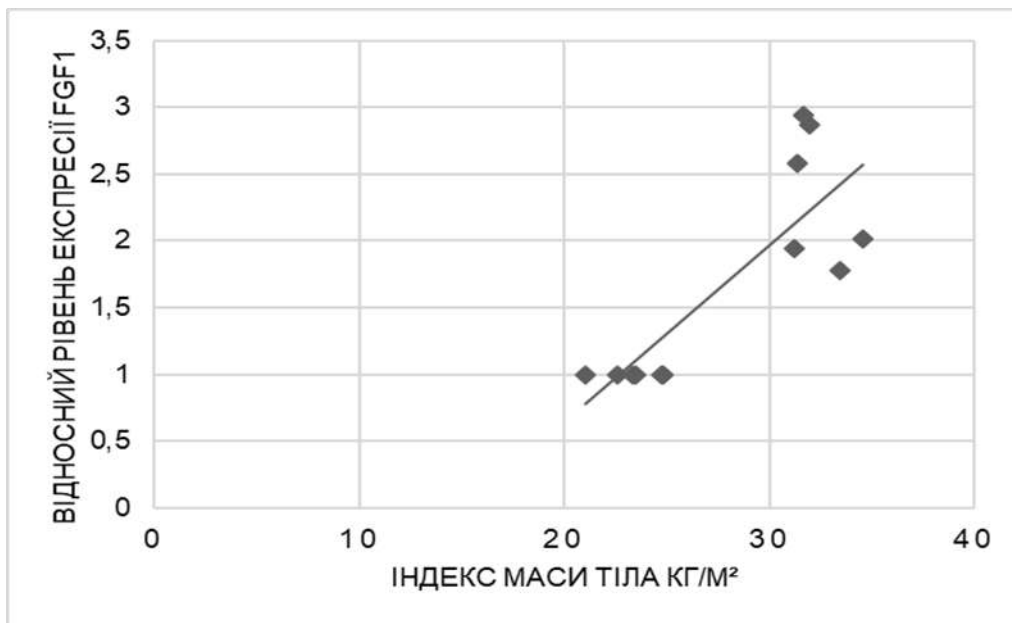


Рис. 3.3. Відносний рівень експресії генів *FGF1* та *FGF2* у підшкірній жировій тканині чоловіків без ознак ожиріння (Контроль), а також осіб з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози (Ожиріння+НТГ) та ожирінням, ускладненим порушеною толерантністю до глюкози (Ожиріння+ПТГ).

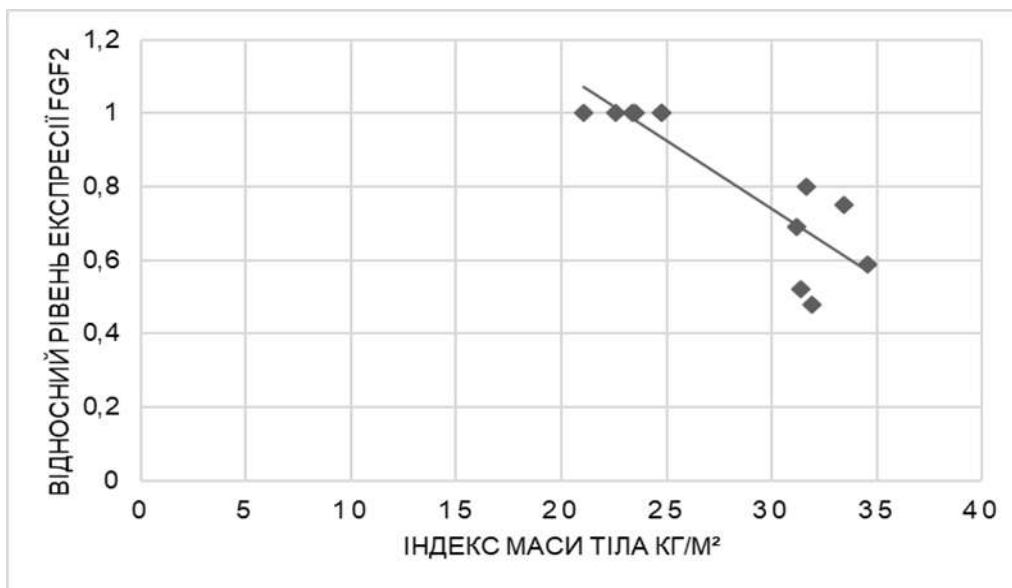
*Примітки:* величину експресії генів *FGF1* та *FGF2* нормалізували по експресії бета-актину, причому рівень експресії досліджених генів у контролі був прийнятим за 100%; n=6

На рис. 3.6. представлені дані по вивченню рівня експресії можливих регуляторів факторів росту фібробластів. Транскрипційні фактори HIF1A та EPAS1/HIF2A опосередковують численні індуковані гіпоксією процеси, включаючи проліферацію, ангиогенез, диференціацію. Експресія гена HIF1A підвищується на 25% у чоловіків з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози порівняно з контрольними особами. Однак, резистентність до інсуліну істотно не змінює експресію даного гена порівняно з групою чоловіків з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози. Крім того, не було виявлено суттєвих змін у рівні

експресії іншого HIF-альфа протеїну – EPAS / HIF2A у підшкірній жировій тканині обох груп чоловіків з ожирінням і з ожирінням, ускладненим порушеною толерантністю до глюкози.



А



Б

Рис 3.4. Кореляція між змінами в експресії генів *FGF1* (А) та *FGF2* (Б) у підшкірній жировій тканині чоловіків за умов ожиріння і нормальної толерантності до глюкози та індексом маси тіла.

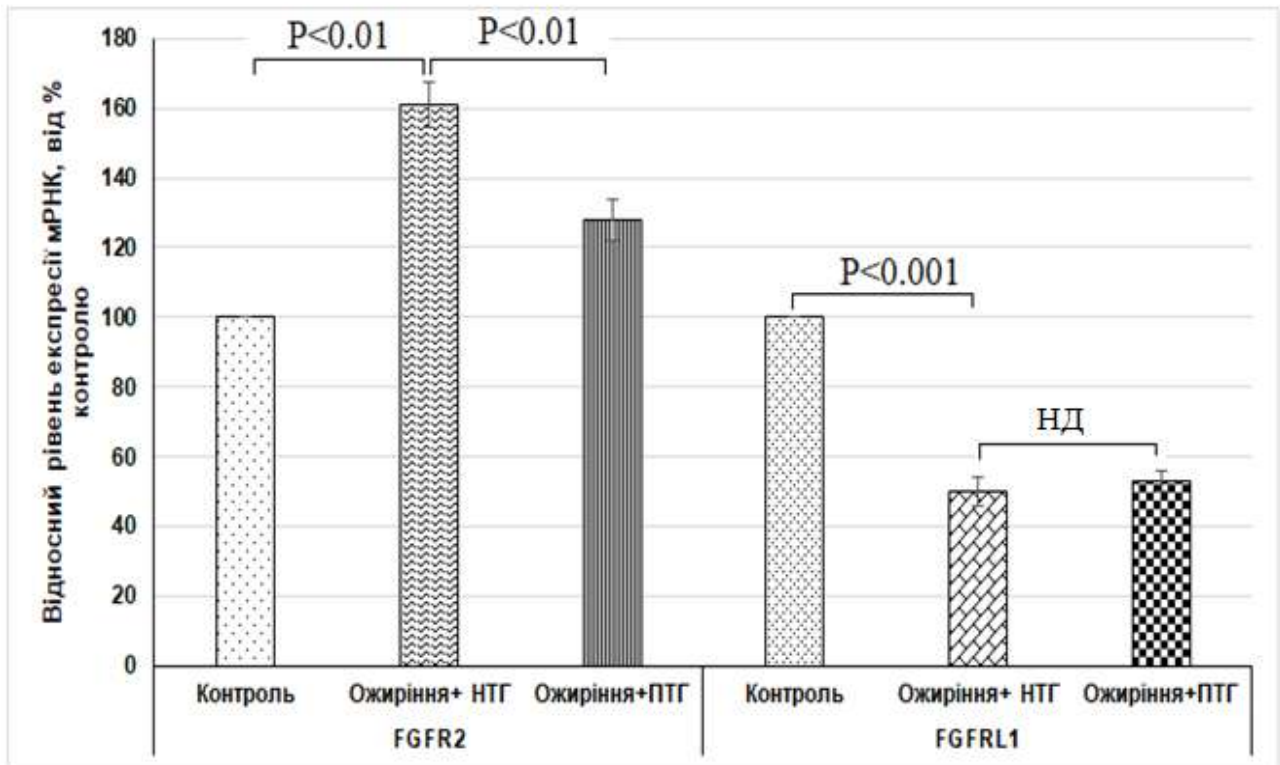


Рис. 3.5. Відносний рівень експресії генів *FGFR2* та *FGFR1* у підшкірній жировій тканині чоловіків без ознак ожиріння (Контроль), а також осіб з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози (Ожиріння+НТГ) та ожирінням, ускладненим порушеною толерантністю до глюкози (Ожиріння+ПТГ).

*Примітки:* величину експресії генів *FGFR2* та *FGFR1* нормалізували по експресії бета-актину, причому рівень експресії досліджених генів у контролі був прийнятим за 100%; n=6; НД – не достовірно.

Виявлені зміни у експресії гена *HIF1A* у підшкірній жировій тканині чоловіків за ожиріння з нормальною толерантністю до глюкози чітко корелювали з індексом маси тіла:  $r = 0,71126$  (рис. 3.7).

Окрім того, ми досліджували рівень експресії транскрипційного фактора *E2F8*, який може створювати комплекси з іншими членами родини *E2F* і разом з протеїном *HIF $\alpha$*  регулює експресію генів мішеней, контролюючи тим самим клітинний цикл, сприяє ангіогенезу за рахунок зв'язування з промотором гена *VEGF-A* й активує експресію ендотеліального фактора росту судин. Як показано на

рис. 3.8. у підшкірній жировій тканині чоловіків як з ожирінням та нормальною толерантністю до глюкози, так і за ожиріння, ускладненим порушеною толерантністю до глюкози, підвищується рівень експресії мРНК E2F8, відповідно (+146 % та +357 %) при порівнянні з контрольною групою, а при порівнянні чоловіків з ожирінням, ускладненим порушеною толерантністю до глюкози, з групою, що мали ожиріння та нормальну толерантність до глюкози збільшення було значно меншим (+86 %).

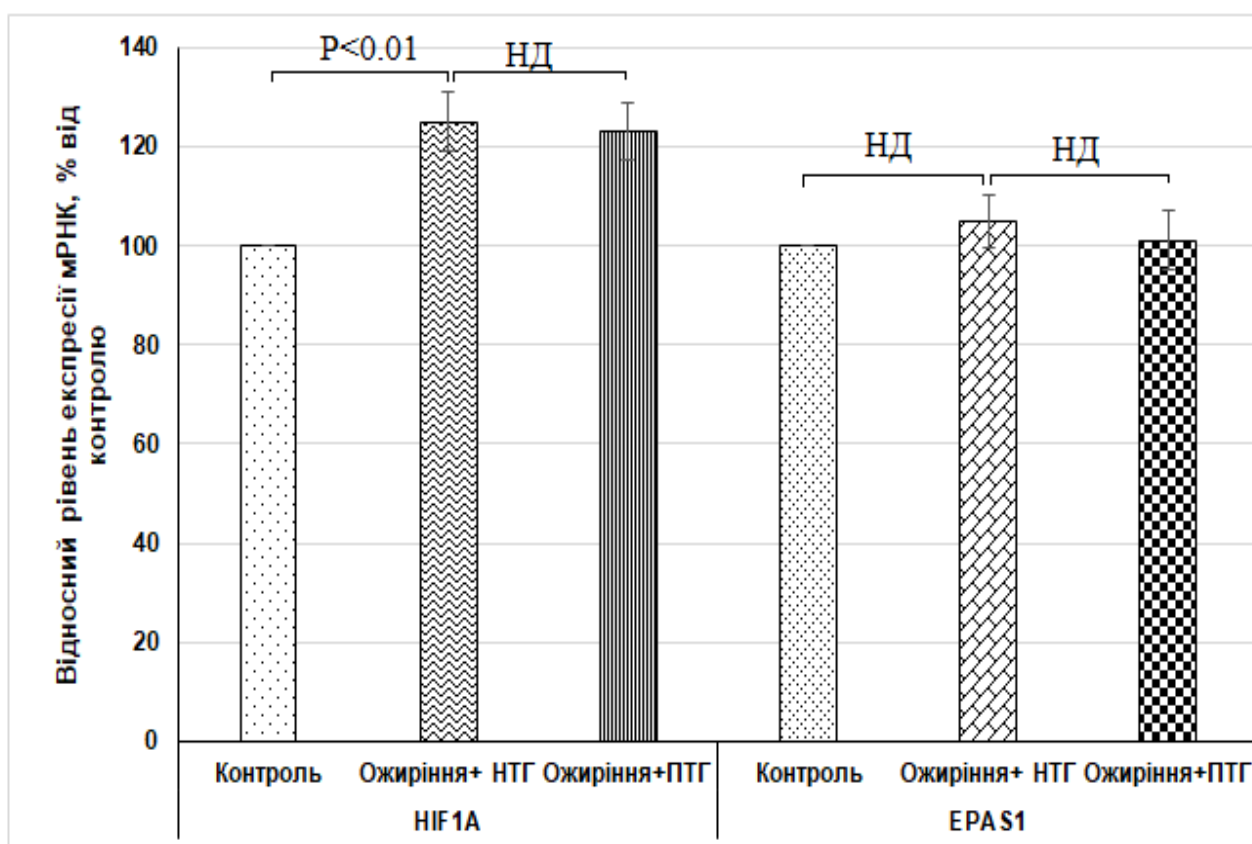


Рис. 3.6. Відносний рівень експресії генів *HIF1A* та *EPAS1* у підшкірній жировій тканині чоловіків без ознак ожиріння (Контроль), а також осіб з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози (Ожиріння+НТГ) та ожирінням, ускладненим порушеною толерантністю до глюкози (Ожиріння+ПТГ).

*Примітки:* величину експресії генів *HIF1A* та *EPAS1* нормалізували по експресії бета-актину, причому рівень експресії досліджених генів у контролі був прийнятим за 100%, n=6, НД – не достовірно.

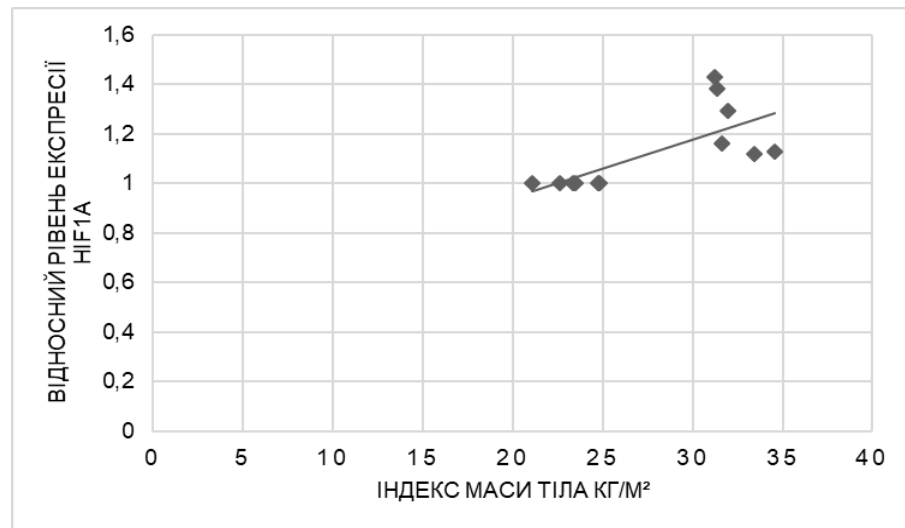


Рис. 3.7. Кореляційна залежність між змінами в експресії гена *HIF1A* у підшкірній жировій тканині чоловіків за умов ожиріння і нормальної толерантності до глюкози та індексом маси тіла.

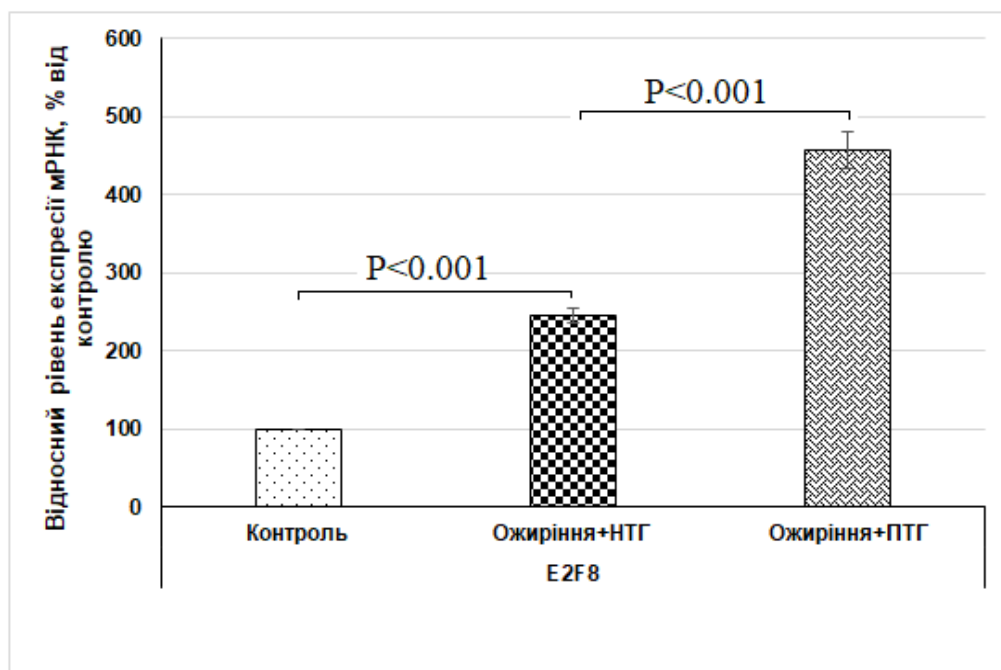


Рис. 3.8. Відносний рівень експресії гена *E2F8* у підшкірній жировій тканині чоловіків без ознак ожиріння (Контроль), а також осіб з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози (Ожиріння+НТГ) та ожирінням, ускладненим порушеною толерантністю до глюкози (Ожиріння+ПТГ).

*Примітки:* Величину експресії гена *E2F8* нормалізували по експресії бета-актину, причому рівень експресії дослідженого гена у контролі був прийнятим за 100%; n=6.

Виявлені зміни у експресії гена E2F8 у підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням й нормальною толерантністю до глюкози чітко корелювали з індексом маси тіла:  $r = 0,949002$  (рис. 3.9).

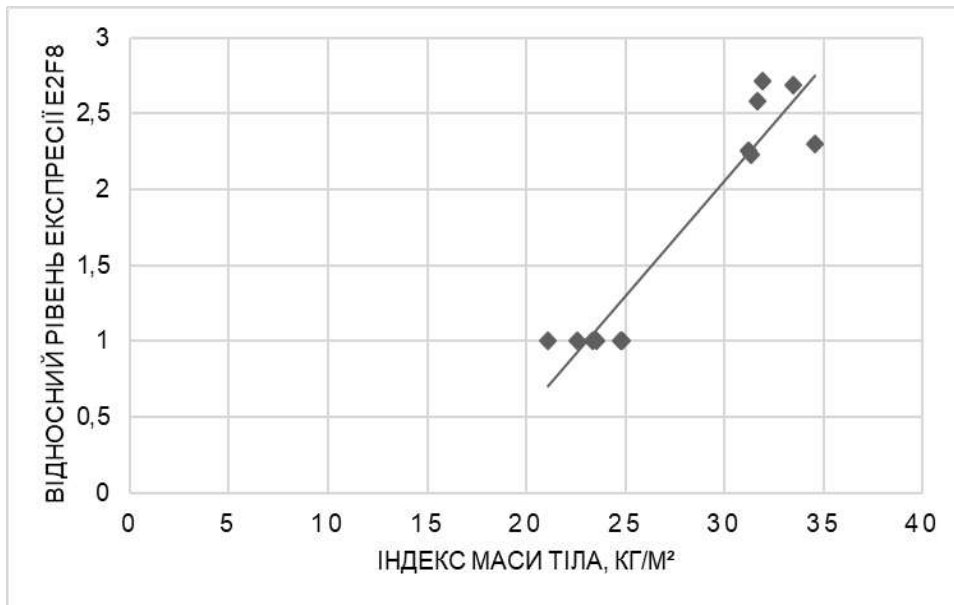


Рис. 3.9. Кореляція між змінами в експресії гена E2F8 у підшкірній жировій тканині чоловіків за умов ожиріння і нормальної толерантності до глюкози та індексом маси тіла.

Крім того, було встановлено, що є чітка кореляційна залежність між змінами в експресії гена E2F8 у підшкірній жировій тканині чоловіків за умов ожиріння, ускладненим порушеною толерантністю до глюкози та індексом чутливості до інсуліну:  $r = 0,724966$  (рис.3.10).

Також ми досліджували експресію гена *PDGFC*, який є важливим фактором росту і регулює ембріональний розвиток, проліферацію, міграцію та виживання клітин, а також гена *CYR61*. Рис. 3.11. демонструє зміни рівня експресії мРНК *PDGFC* та *CYR61* у підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням з нормальною та порушеною толерантністю до глюкози у порівнянні з контрольною групою чоловіків.

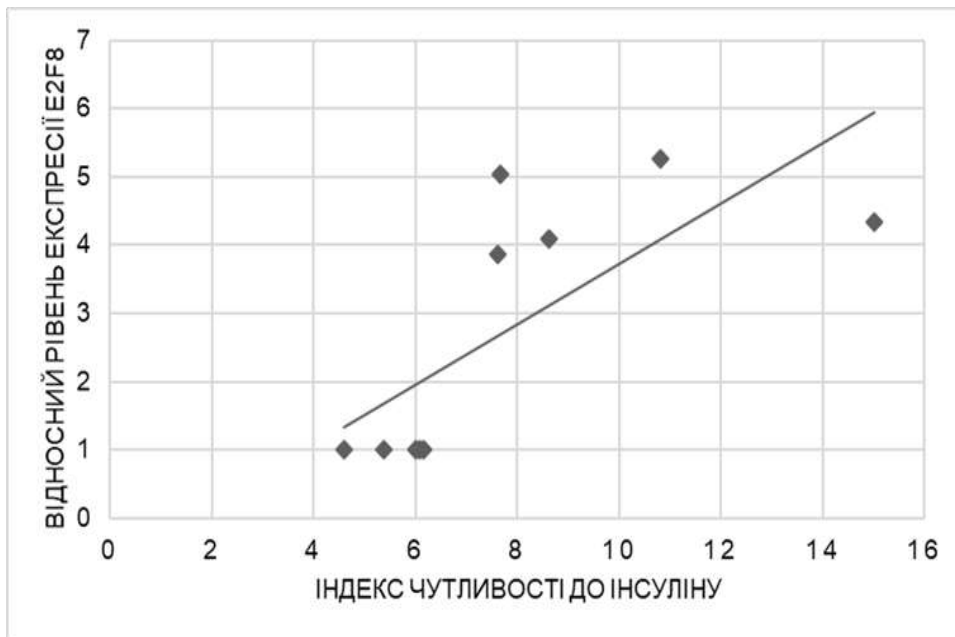


Рис. 3.10. Кореляційна залежність між змінами в експресії гена E2F8 у підшкірній жировій тканині за умов ожиріння, ускладненим порушеною толерантністю до глюкози та індексом чутливості до інсуліну

Із даних, приведених на цьому рисунку видно, що ожиріння змінює рівень експресії обох цих генів у підшкірній жировій тканині чоловіків з нормальною толерантністю до глюкози, але в протилежних напрямках: на 17 % знижує рівень *PDGFC* і на 81 % підвищує рівень експресії *CYR61*. Разом з тим, розвиток резистентності до інсуліну істотно не впливав на рівень експресії гена *PDGFC*, але знижував рівень експресії гена *CYR61* на 23 %, що вказує на залежність експресії гена *CYR61* від чутливості до інсуліну.

Надлишок жирової тканини за ожиріння пов'язаний з підвищеним ризиком смертності через серцево-судинні захворювання і, частково, через супутні захворювання, такі як гіпертонія, дисліпідемія та діабет 2 типу. Первинним регулятором фібринолізу є інгібітор активатора плазміногену (PAI-1), який блокує утворення плазміну й розщеплення згустків фібрину за рахунок інгібування тканинного (PLAT) й урокіназного (PLAU) типів активаторів плазміногену, які забезпечують протеоліз шляхом перетворення плазміногену у плазмін і наступною

деградацією компонентів позаклітинного матриксу. PAI-1 контролює клітинну адгезію і міграцію у позасудинному просторі й тому може впливати на розвиток утворення атеросклеротичних бляшок [166]. Але дефіцит PAI-1 призводить до прискореного фібринолізу і кровотечі. Тому є важливим дослідити вплив ожиріння і його метаболічного ускладнення, а саме резистентності до інсуліну, на компоненти фібринолітичної системи.

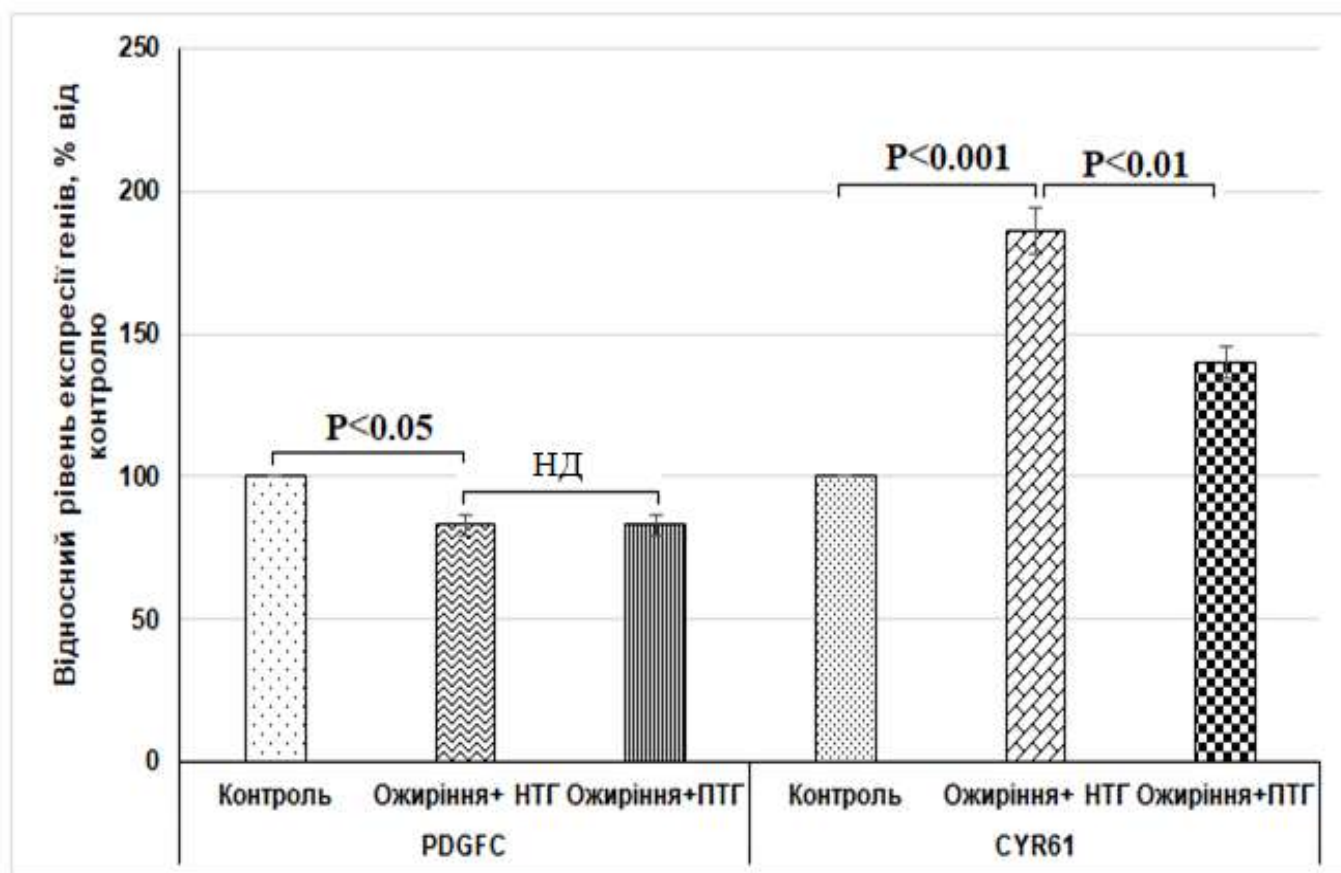


Рис. 3.11. Відносний рівень експресії генів PDGFC та CYR61 у підшкірній жировій тканині чоловіків без ознак ожиріння (Контроль), а також осіб з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози (Ожиріння+НТГ) та ожирінням, ускладненим порушеною толерантністю до глюкози (Ожиріння+ПТГ).

*Примітки:* величину експресії генів PDGFC та CYR61 нормалізували по експресії бета-актину, причому рівень експресії досліджених генів у контролі був прийнятим за 100%; n=6



Ми досліджували рівень експресії генів *PAI-1* та *PLAT* у підшкірній жировій тканині чоловіків і показали, що в групі чоловіків з ожирінням й нормальною толерантністю до глюкози спостерігається підвищений на 34 % рівень експресії мРНК *PLAT* і на 440 % мРНК *PAI-1* порівняно з контрольною групою (рис. 3.12). В той же час, у чоловіків з ожирінням, ускладненим порушеною толерантністю до глюкози, рівень експресії гена *PLAT* знижувався на 20% порівняно з групою чоловіків з ожирінням та нормальною толерантністю до глюкози, але залишається збільшеним порівняно з контрольною групою. А рівень експресії гена *SERPINE1* збільшується на 621% за резистентності до інсуліну порівняно з групою худих чоловіків.

Збільшений рівень *PAI-1* (*SERPINE1*) корелює з індексом маси тіла і може брати участь в рості жирової тканини, відповідати за тромбоз і ендотеліальну дисфункцію [167]. Збільшення секреції адипоцитами цього адипокіна може бути відповіддю гіперінсулінемії, яка спостерігається за резистентності до інсуліну. Наші дослідження подібні до досліджень, проведених Ahirwar et al. [167], які показали збільшений рівень *PAI-1* у осіб з ожирінням та метаболічним синдромом і що погіршення чутливості до інсуліну сприяє протромботичному стану і підвищує запалення.

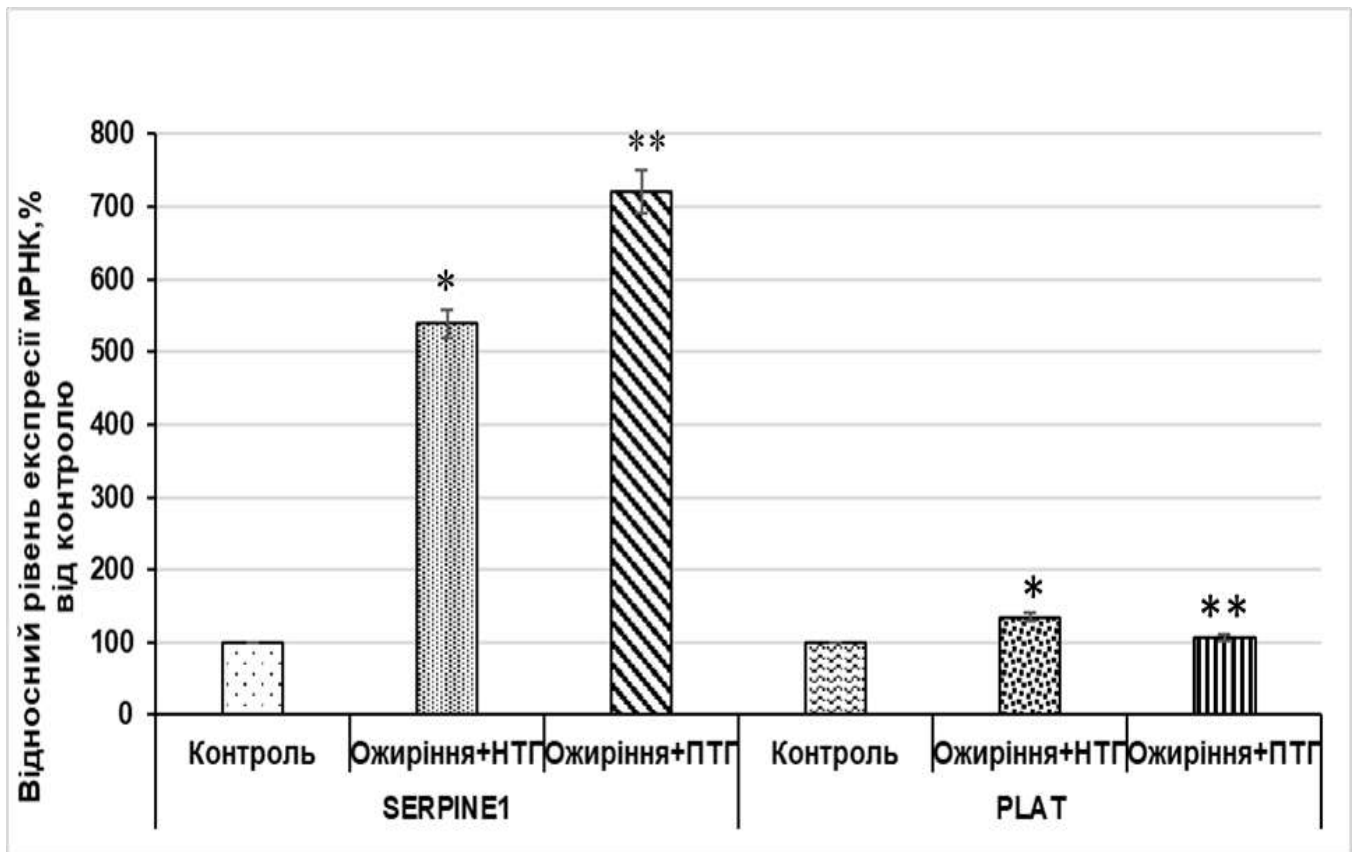
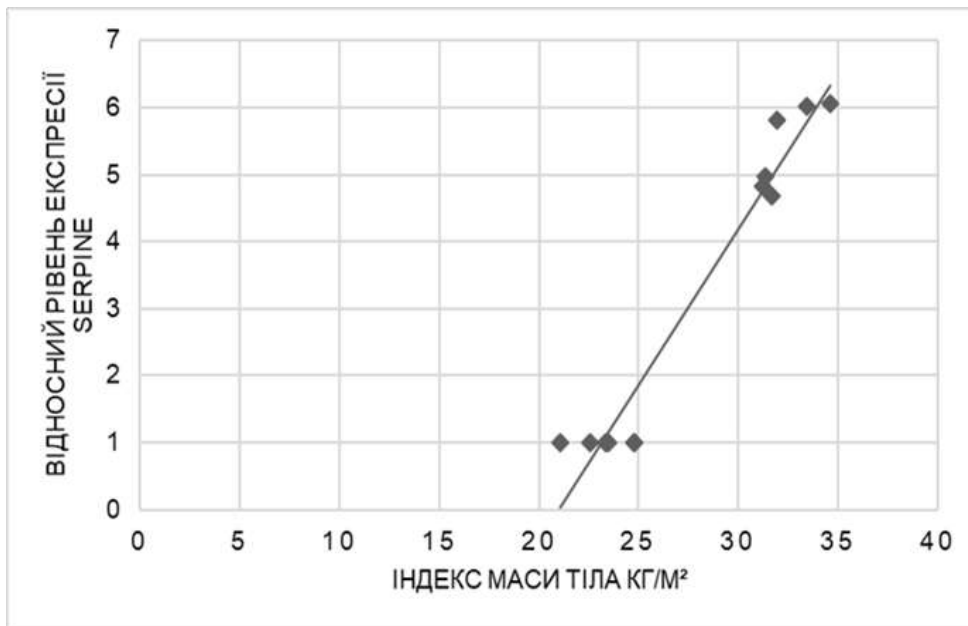


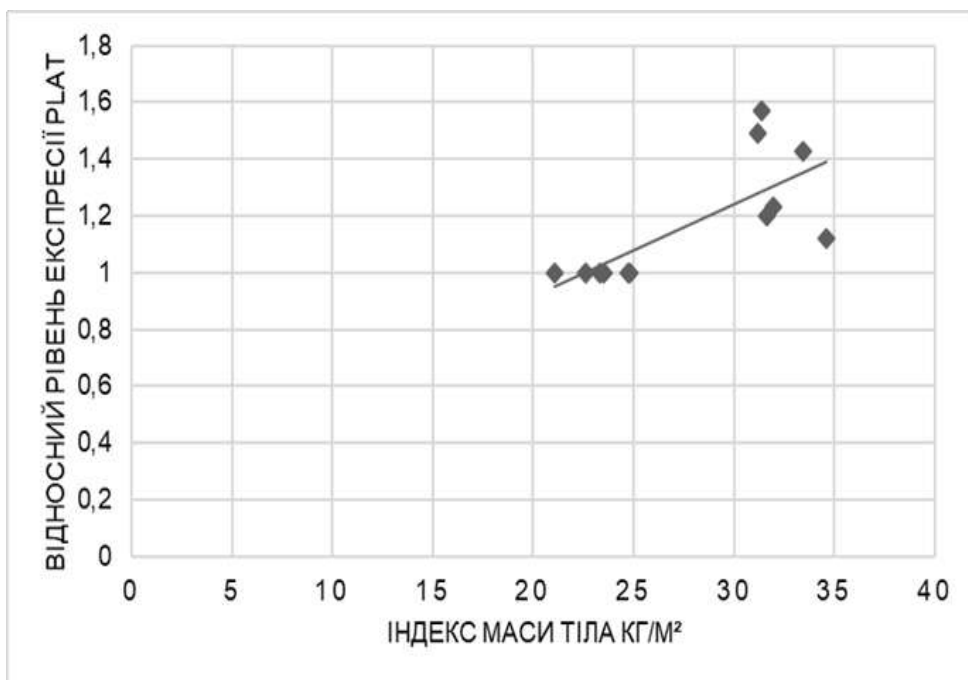
Рис. 3.12. Відносний рівень експресії генів *SERPINE1* (*PAI-1*) та *PLAT* у підшкірній жировій тканині чоловіків без ознак ожиріння (Контроль), а також осіб з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози (Ожиріння+НТГ) та ожирінням, ускладненим порушеною толерантністю до глюкози (Ожиріння+ПТГ).

*Примітки:* величину експресії генів *SERPINE1* та *PLAT* нормалізували по експресії бета-актину, причому рівень експресії досліджених генів у контролі був прийнятим за 100%; n=6; \* -  $P < 0,05$  у порівнянні з контролем; \*\* -  $P < 0,05$  у порівнянні групи з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози.

Проведений кореляційний аналіз змін експресії генів *SERPINE1* та *PLAT* у групі чоловіків з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози та індексом маси тіла показав наявність чіткої позитивної кореляції між цими показниками:  $r = 0,975282$ ;  $r = 0,737631$  (рис. 3.13).



А



Б

Рис. 3.13. Кореляційна залежність між зміною експресії генів *SERPINE1* (А) й *PLAT* (Б) у підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози та індексом маси тіла.

На рис. 3.14 показано, що у підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням та нормальною толерантністю до глюкози підвищується рівень експресії гена *PLAU* на 25 % порівняно з контрольною групою, а за резистентності до

інсуліну рівень експресії мРНК *PLAU* також зростає (на 43 % порівняно з контролем і на 15 % порівняно з чоловіками з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози).

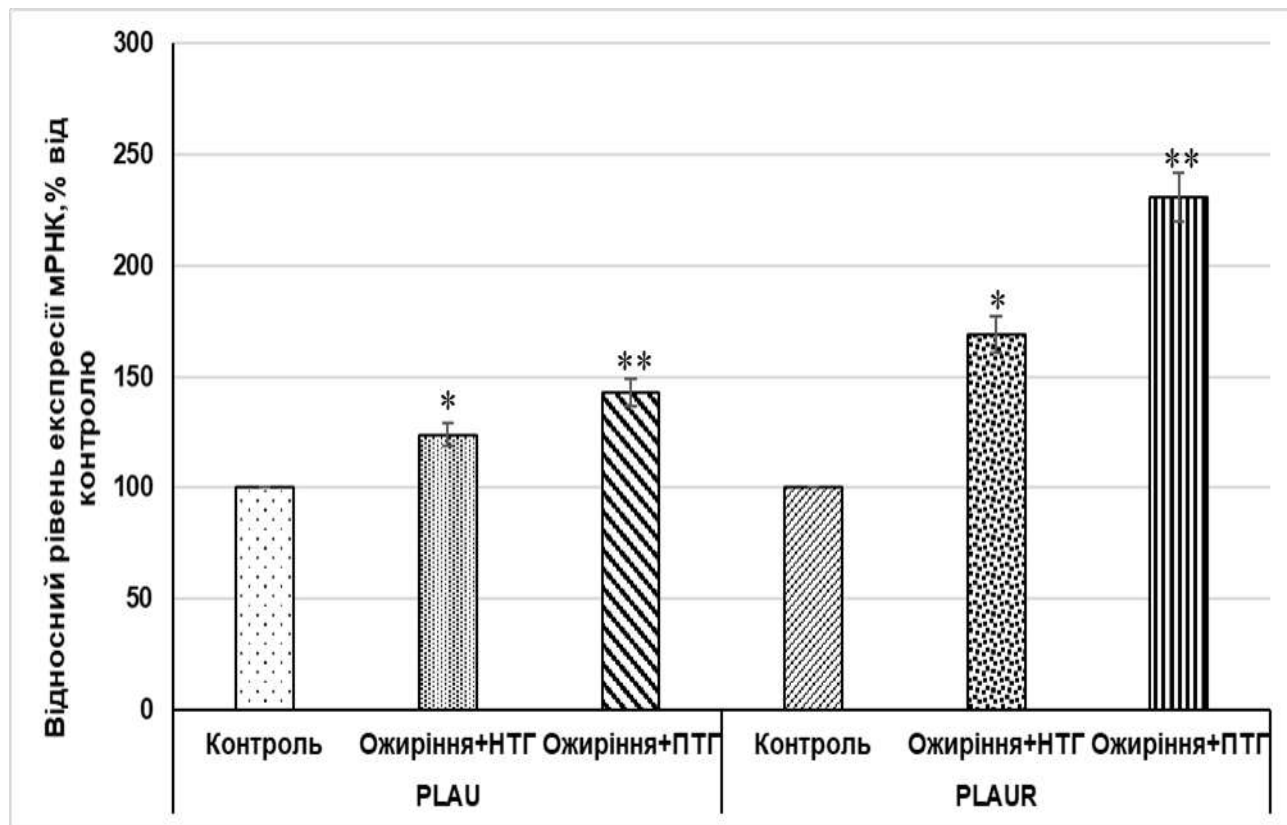


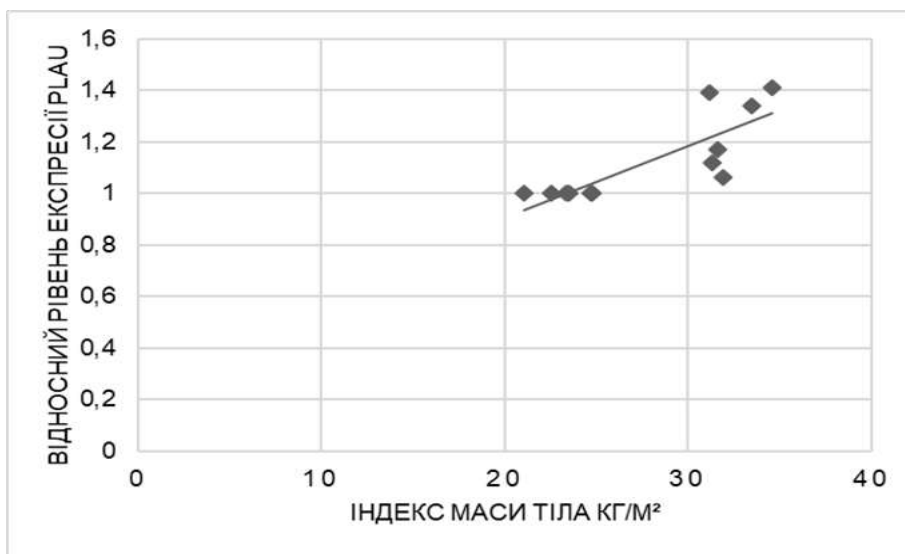
Рис. 3.14. Відносний рівень експресії генів *PLAU* та *PLAUR* у підшкірній жировій тканині чоловіків без ознак ожиріння (Контроль), а також осіб з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози (Ожиріння+НТГ) та ожирінням, ускладненим порушеною толерантністю до глюкози (Ожиріння+ПТГ).

*Примітки:* величину експресії генів *PLAU* та *PLAUR* нормалізували по експресії бета-актину, причому рівень експресії досліджених генів у контролі був прийнятим за 100%; n=6; \* -  $P < 0,05$  у порівнянні з контролем; \*\* -  $P < 0,05$  у порівнянні групи з ожирінням й нормальною толерантністю до глюкози.

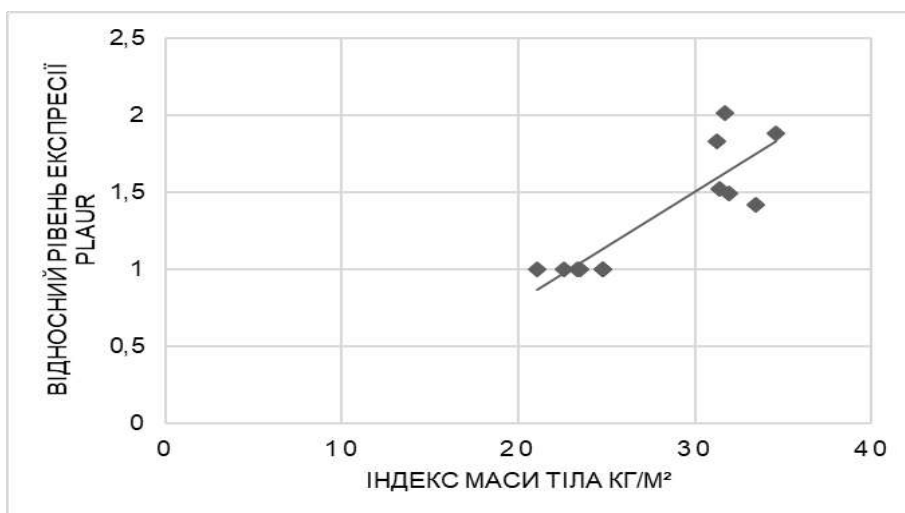
Важливо відзначити, що експресія гена *PLAUR*, який взаємодіє з *PLAU*, також на 69 % підвищується у чоловіків з ожирінням й нормальною толерантністю до глюкози порівняно з контролем. Однак, ожиріння, ускладнене порушеною

толерантністю до глюкози, асоціюється з більш вираженим збільшенням (на 131 %) рівнем експресії мРНК *PLAUR* порівняно з контролем, але при порівнянні з групою чоловіків, що мали ожиріння і нормальну толерантність до глюкози, це збільшення було значно меншим (+37 %).

Виявлені зміни в експресії генів *PLAU* та *PLAUR* у підшкірній жировій тканині чоловіків за умов ожиріння з нормальною толерантністю до глюкози чітко корелювали з індексом маси тіла:  $r = 0,822374$ ;  $r = 0,875824$  (рис.15)



А



Б

Рис.3.15. Кореляція між змінами в експресії генів *PLAU* (А) та *PLAUR* (Б) у підшкірній жировій тканині чоловіків за умов ожиріння і нормальної толерантності до глюкози та індексом маси тіла.

На рис. 3.16 показано, що у підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням та нормальною толерантністю до глюкози підвищується рівень експресії гена *CLEC3B* на 66 % порівняно з контрольною групою, а за резистентності до інсуліну рівень експресії мРНК *CLEC3B* знижується майже вдвічі, причому до рівня, що на 16 % нижче контролю.

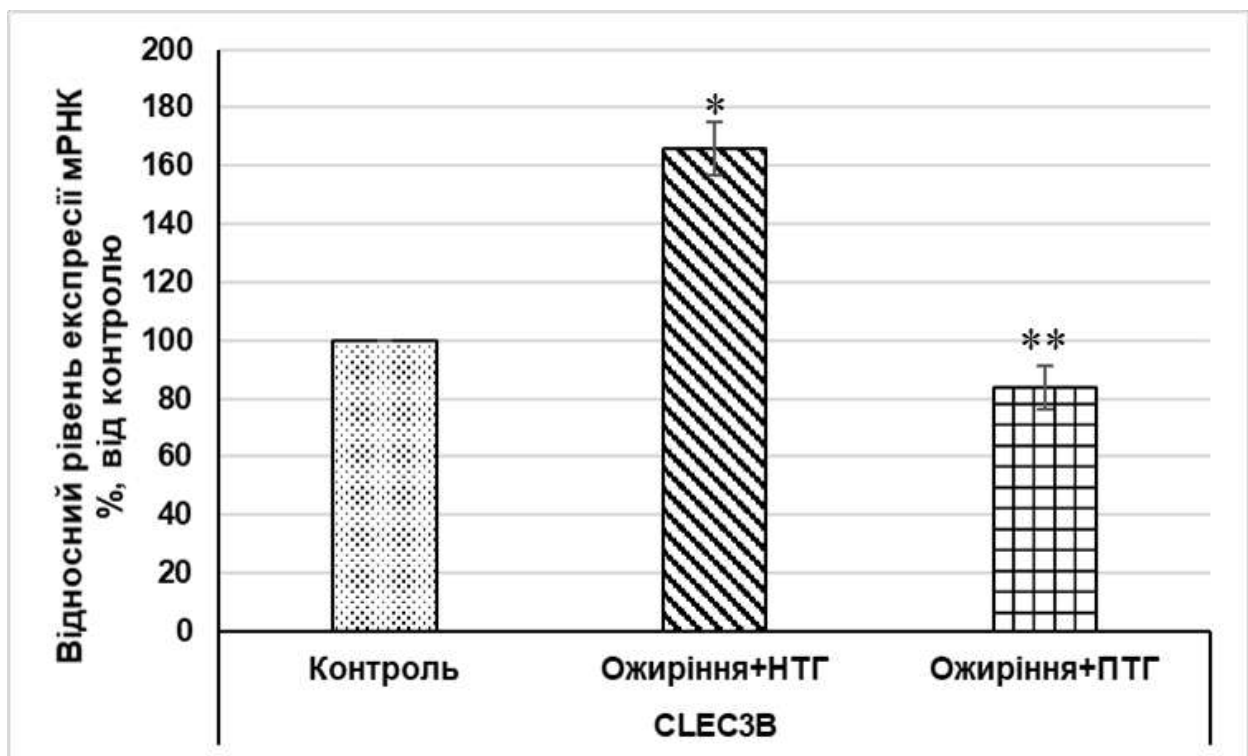


Рис. 3.16. Відносний рівень експресії гена *CLEC3B* у підшкірній жировій тканині чоловіків без ознак ожиріння (Контроль), а також осіб з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози (Ожиріння+НТГ) та ожирінням, ускладненим порушеною толерантністю до глюкози (Ожиріння+ПТГ).

*Примітки:* величину експресії гена *CLEC3B* нормалізували по експресії бета-актину, причому рівень експресії досліджених генів у контролі був прийнятим за 100%; n=6; \* -  $P < 0,05$  у порівнянні з контролем; \*\* -  $P < 0,05$  у порівнянні групи з ожирінням й нормальною толерантністю до глюкози.

Виявлені зміни в експресії гена *CLEC3B* у підшкірній жировій тканині чоловіків за умов ожиріння з нормальною толерантністю до глюкози чітко корелювали з індексом маси тіла:  $r = 0,916302$  (рис. 3.17.)

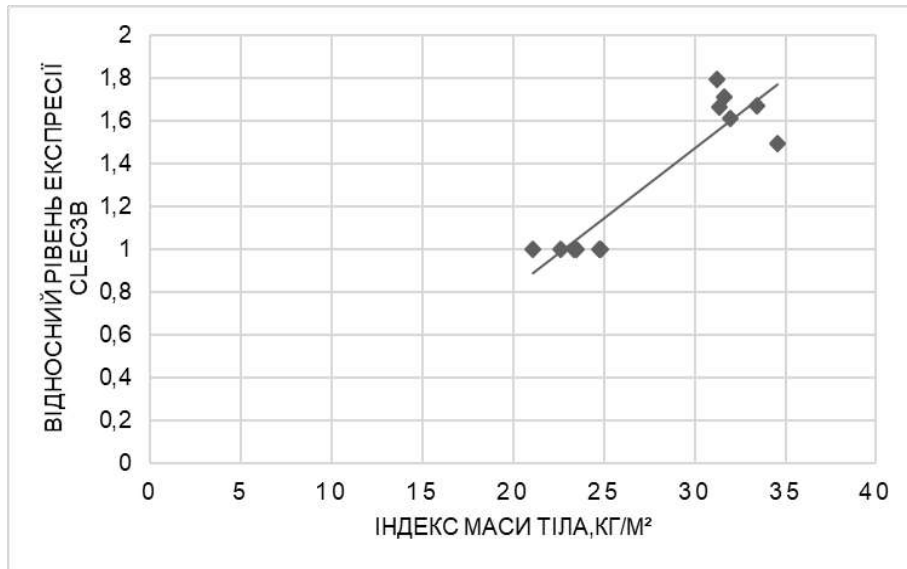


Рис. 3.17. Кореляція між змінами в експресії гена *CLEC3B* у підшкірній жировій тканині чоловіків за умов ожиріння і нормальної толерантності до глюкози та індексом маси тіла.

### **3.2. Експресія генів, що кодують протеїнфосфатази родини DUSP, у підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням і нормальною та порушеною толерантністю до глюкози**

Ожиріння призводить до метаболічного синдрому та резистентності до інсуліну і обумовлено це активацією відповідей клітин на стрес. Підвищений рівень вільних жирних кислот бере участь у цьому процесі за рахунок активації сигнальних шляхів, які перешкоджають передачі сигналів від інсуліну й знижують відповідь на цей гормон. Серед цих шляхів JNK та MAP кінази, активацію яких модулюють протеїнові MAPK-фосфатази, причому вони є цікавими кандидатами для регулювання стресових реакцій, залучених до різних захворювань, які пов'язані з проліферативними процесами, включаючи ожиріння та його метаболічні

ускладнення. У цьому дослідженні ми вивчали, як ожиріння впливає на рівень експресії різних подвійно-специфічних фосфатаз (DUSP), які можуть бути мішенями для терапевтичних цілей у поліпшенні чутливості до інсуліну, а також відіграють велику роль у регуляції ростових процесів.

Як показано на рис. 3.18, рівень експресії мРНК *DUSP1* знижується на 28 % у підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози порівняно з контрольною групою.

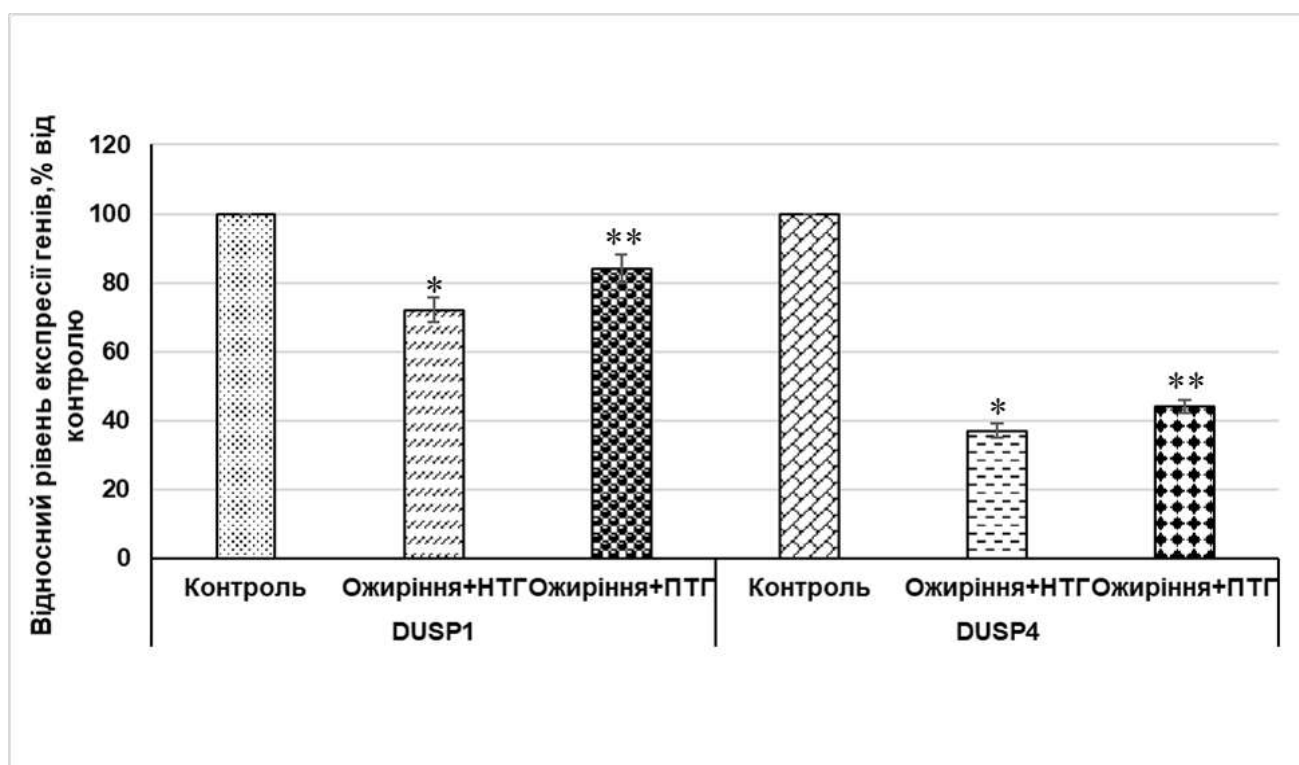


Рис. 3.18. Відносний рівень експресії генів *DUSP1* та *DUSP4* у підшкірній жировій тканині чоловіків без ознак ожиріння (Контроль), а також осіб з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози (Ожиріння+НТГ) та ожирінням, ускладненим порушеною толерантністю до глюкози (Ожиріння+ПТГ).

*Примітки:* величину експресії генів *DUSP1* та *DUSP4* нормалізували по експресії бета-актину, причому рівень експресії досліджених генів у контролі був прийнятим за 100%; n=6; \* -  $P < 0,05$  у порівнянні з контролем; \*\* -  $P < 0,05$  у порівнянні групи з ожирінням й нормальною толерантністю до глюкози.



Однак, за ожиріння, ускладненого порушеною толерантністю до глюкози рівень експресії гена *DUSP1* знижується в меншій мірі (-16 %) у порівнянні з контролем, а порівняно з групою чоловіків з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози підвищується на 17 %. Знижена експресія *DUSP1* може мати відношення до розвитку ожиріння, оскільки вона бере участь у регуляції клітинної проліферації через дефосфорилування як фосфосерину, так і треоніну MAP-кіназ. Дослідження рівня експресії фосфатази *DUSP4* демонструє, що у підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози майже в три рази знижується рівень експресії даного гена порівняно з контрольною групою чоловіків, що не мали ознак ожиріння. Крім того, розвиток резистентності до інсуліну на 18 % підвищує рівень експресії гена *DUSP4* порівняно з групою чоловіків з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози.

Як видно із даних, приведених на рис. 3.19, рівень експресії генів *DUSP6* і *DUSP22* у підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням й нормальною толерантністю до глюкози знижується на 40 % та 27 %, відповідно, порівняно з контролем.

У той же час, у групі чоловіків з ожирінням ускладненим, порушеною толерантністю до глюкози, спостерігається підвищений рівень експресії генів *DUSP6* на 20 % і *DUSP22* на 15 % у підшкірній жировій тканині порівняно з групою чоловіків з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози, але залишаються зниженими порівняно з контролем.

Разом з тим, рівень експресії гена *PTEN* у підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози, як показано на рис. 3.20, знижується на 30 % порівняно з контрольною групою, а резистентність до інсуліну на експресію цього гена істотно не впливає.

У той же час, як показано на рис. 3.20, рівень експресії гена *PTEN* на 30 % знижується у чоловіків з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози, порівняно з особами без ознак ожиріння, а резистентність до інсуліну на експресію цього гена істотно не впливає.

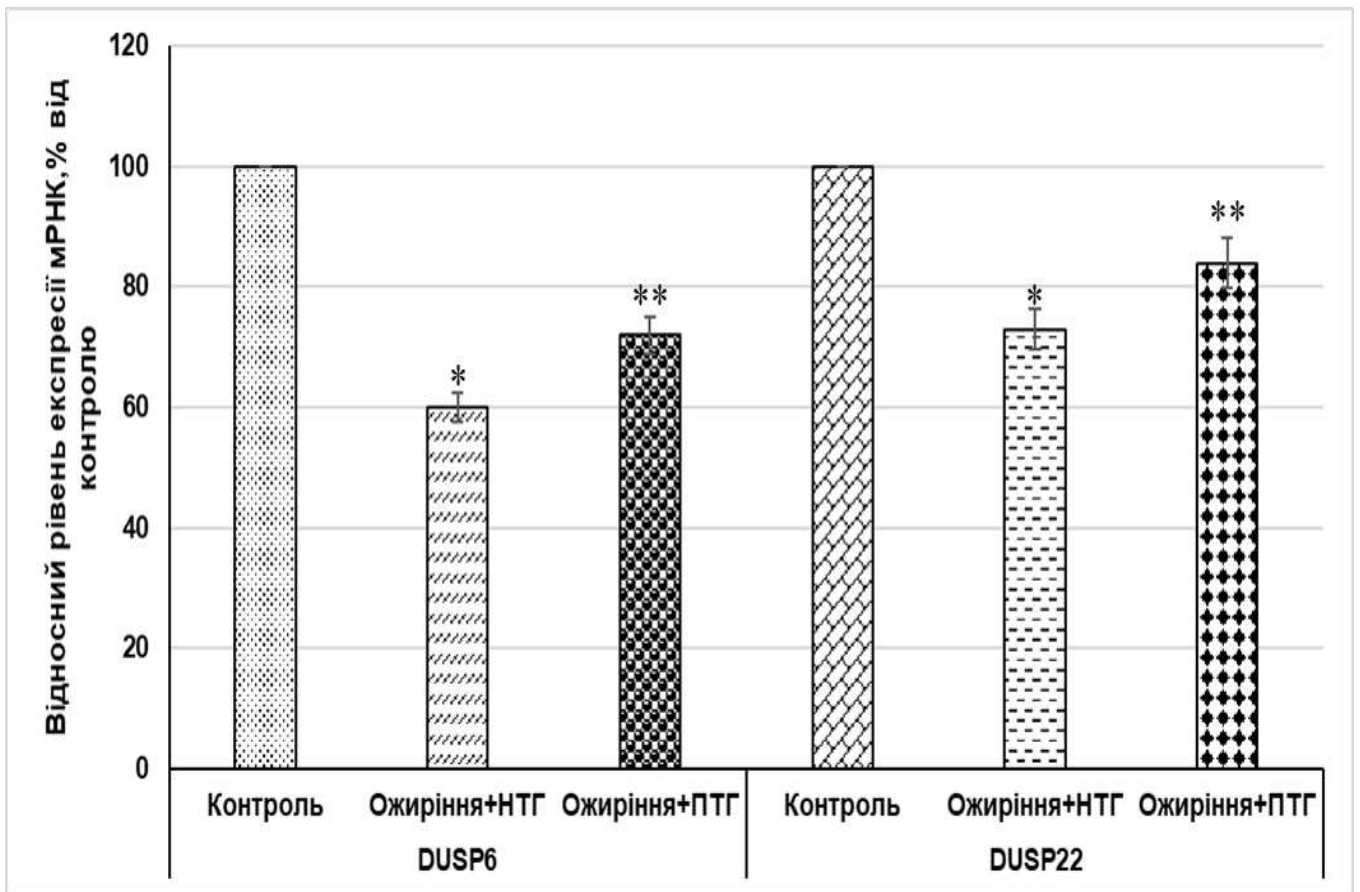


Рис. 3.19. Відносний рівень експресії генів *DUSP6* та *DUSP22* у підшкірній жировій тканині чоловіків без ознак ожиріння (Контроль), а також осіб з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози (Ожиріння+НТГ) та ожирінням, ускладненим порушеною толерантністю до глюкози (Ожиріння+ПТГ).

*Примітки:* величину експресії генів *DUSP6* та *DUSP22* нормалізували по експресії бета-актину, причому рівень експресії досліджених генів у контролі був прийнятим за 100%;  $n = 6$ ; \* -  $P < 0,05$  у порівнянні з контролем; \*\* -  $P < 0,05$  у порівнянні групи з ожирінням й нормальною толерантністю до глюкози.

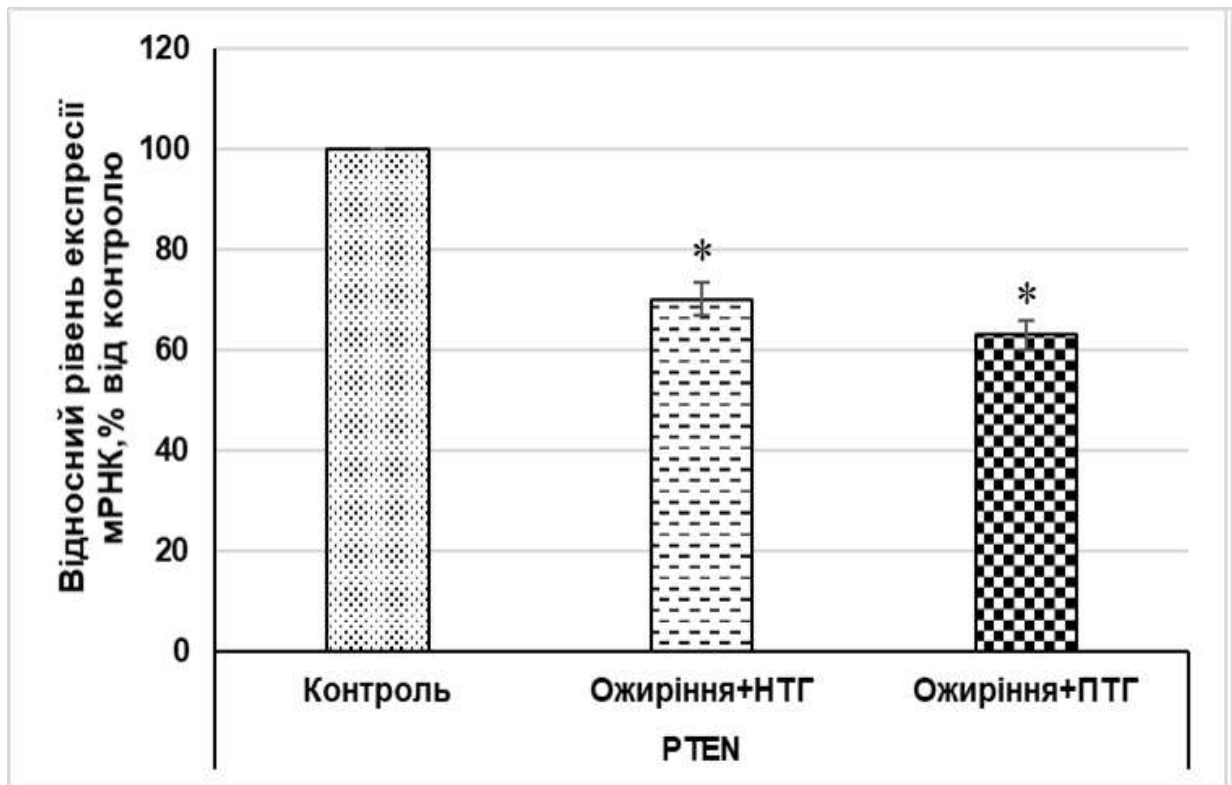


Рис. 3.20. Відносний рівень експресії мРНК *PTEN* у підшкірній жировій тканині чоловіків без ознак ожиріння (Контроль), а також осіб з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози (Ожиріння+НТГ) та ожирінням, ускладненим порушеною толерантністю до глюкози (Ожиріння+ПТГ).

*Примітки:* величину експресії гена *PTEN* нормалізували по експресії бета-актину, причому рівень експресії досліджених генів у контролі був прийнятим за 100%; n = 6; \* - P < 0,05 у порівнянні з контролем.

### **3.3. Експресія генів, що кодують фактори росту, причетні до контролю проліферації клітин, у підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням і нормальною та порушеною толерантністю до глюкози**

У дорослих людей адіпогенез відбувається у відповідь на надлишок енергії у організмі. Недавні дослідження показали, що адипоцити підшкірної жирової тканини більш чутливі до інсуліну, ніж ті, які знаходяться у вісцеральних ділянках і

виявляються більш здатними диференціюватися у зрілі адипоцити. Фаза диференціації передбачає перехід від недиференційованих фібробластоподібних преадипоцитів у зрілі круглі адипоцити й характеризуються зміною у морфології клітин від фібробластичних до зрілих жирових клітин [168]. Проліферація адипоцитів є ключовим процесом, пов'язаним з патогенезом ожиріння і резистентністю до інсуліну. Велика кількість транскрипційних факторів беруть участь у регуляції цього процесу.

Тому основним завданням у цьому розділі було дослідити залежність експресії генів *CTGF*, *MYLK*, *MEST*, *TPD52*, *ITGB1* та *ITGAM* від ожиріння і його метаболічного ускладнення – резистентності до інсуліну. Ми також досліджували рівень експресії таких генів, як *FAT1*, *PPDPF*, *CTHRC1*, *EGFL6*, *TLR2*, *TLR4*, *TNF* і *ADD3*, які контролюють проліферацію клітин, їх міграцію та міжклітинні взаємодії. У той же час зміна експресії яких може бути пов'язана з розвитком ожиріння і його метаболічних ускладнень.

Нами було показано, що рівень експресії генів *CTGF* і *MYLK* збільшується у чоловіків з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози порівняно з контролем на 445% та 58%, відповідно, що показано на рис. 3.21. У той час, в осіб з ожирінням, ускладненим толерантністю до глюкози, підвищується рівень експресії гена *CTGF* на 283 %, а рівень експресії гена *MYLK* на 58 % порівняно з групою відносно здорових чоловіків без ознак ожиріння. Крім того, розвиток резистентності до інсуліну призводить до зниження рівня експресії гена *CTGF* на 31%, а рівня експресії гена *MYLK* на 23% порівняно з групою чоловіків з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози (рис. 3.21).

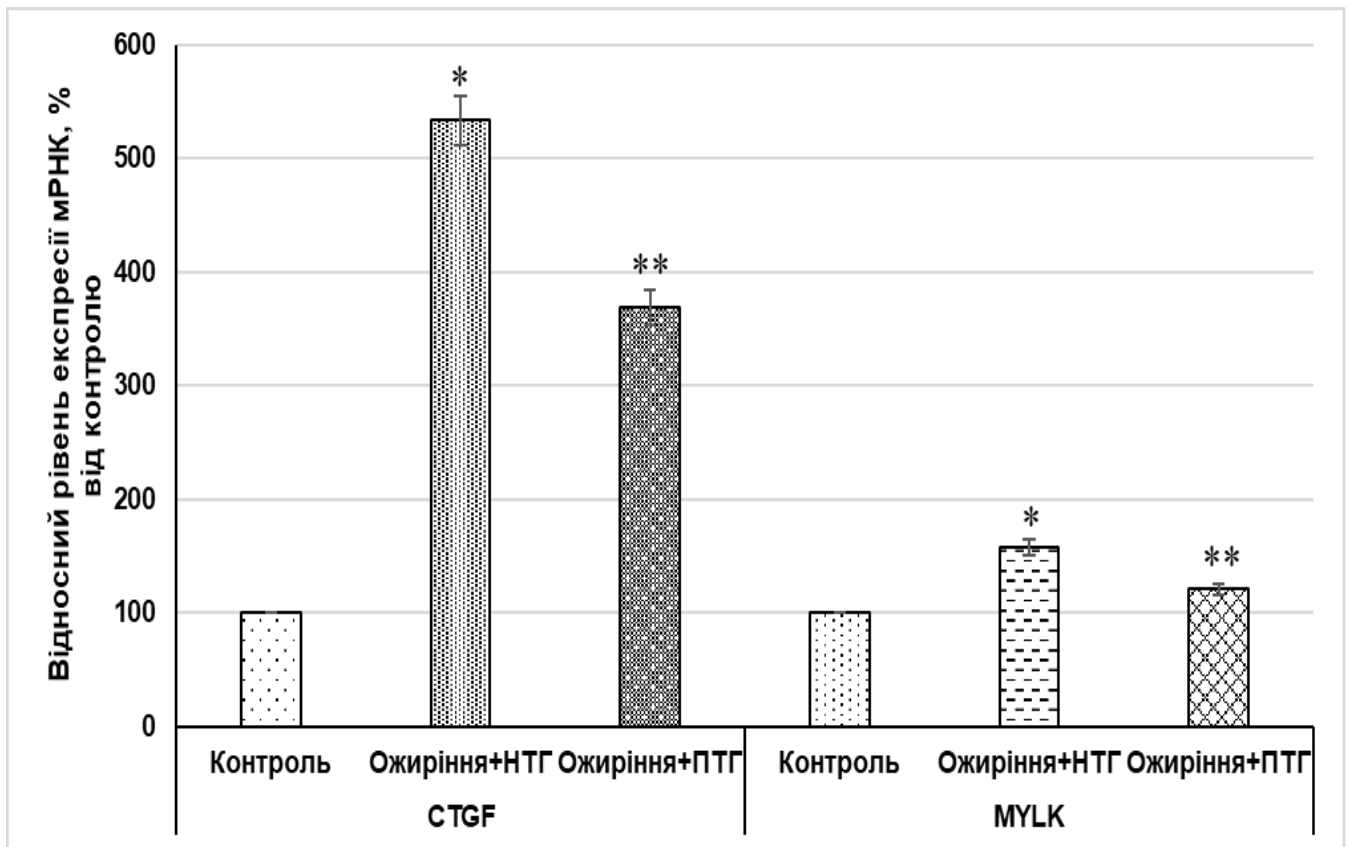
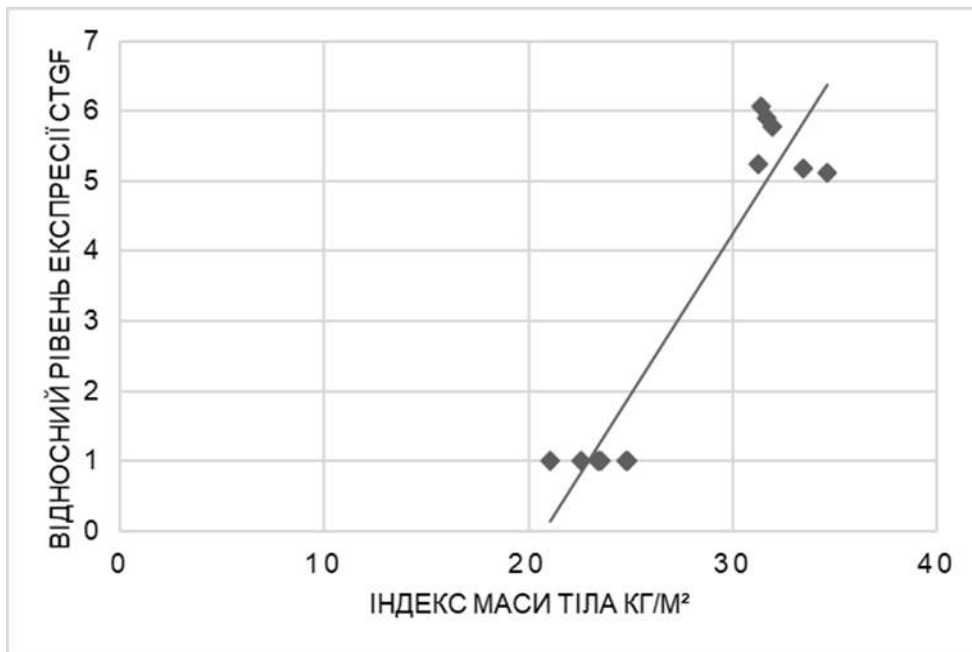


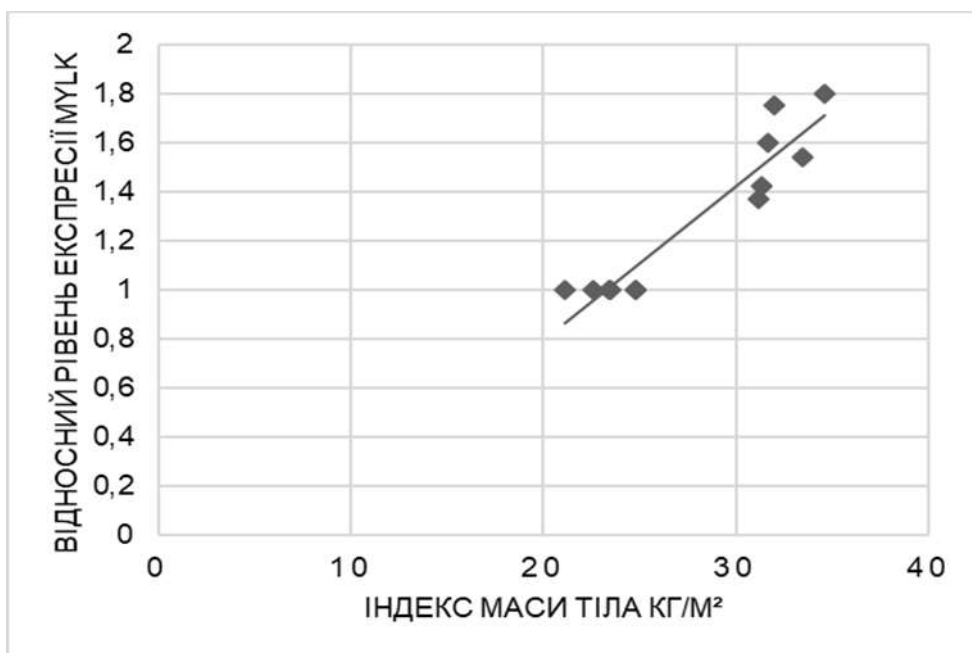
Рис. 3.21. Відносний рівень експресії генів *CTGF* та *MYLK* у підшкірній жировій тканині чоловіків без ознак ожиріння (Контроль), а також осіб з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози (Ожиріння+НТГ) та ожирінням, ускладненим порушеною толерантністю до глюкози (Ожиріння+ПТГ).

*Примітки:* величину експресії генів *CTGF* та *MYLK* нормалізували по експресії бета-актину, причому рівень експресії досліджених генів у контролі був прийнятим за 100%;  $n = 6$ ; \* -  $P < 0,05$  у порівнянні з контролем; \*\* -  $P < 0,05$  у порівнянні групи з ожирінням й нормальною толерантністю до глюкози.

Виявлені зміни в експресії генів *CTGF* та *MYLK* у підшкірній жировій тканині чоловіків за умов ожиріння з нормальною толерантністю до глюкози чітко корелювали з індексом маси тіла:  $r = 0,942231$ ;  $r = 0,942894$  (рис. 3.22).



А



Б

Рис. 3.22. Кореляційна залежність між змінами в експресії генів *CTGF* (А) та *MYLK* (Б) у підшкірній жировій тканині чоловіків за умов ожиріння і нормальної толерантності до глюкози та індексом маси тіла.

Рис. 3.23 демонструє, що ожиріння по-різному впливає на експресію генів *MEST* і *TPD52* у підшкірній жировій тканині чоловіків з нормальною толерантністю

до глюкози: підвищує на 41 % рівень експресії *MEST* і на 70 % рівень експресії *TPD52* у порівнянні з контрольною групою.

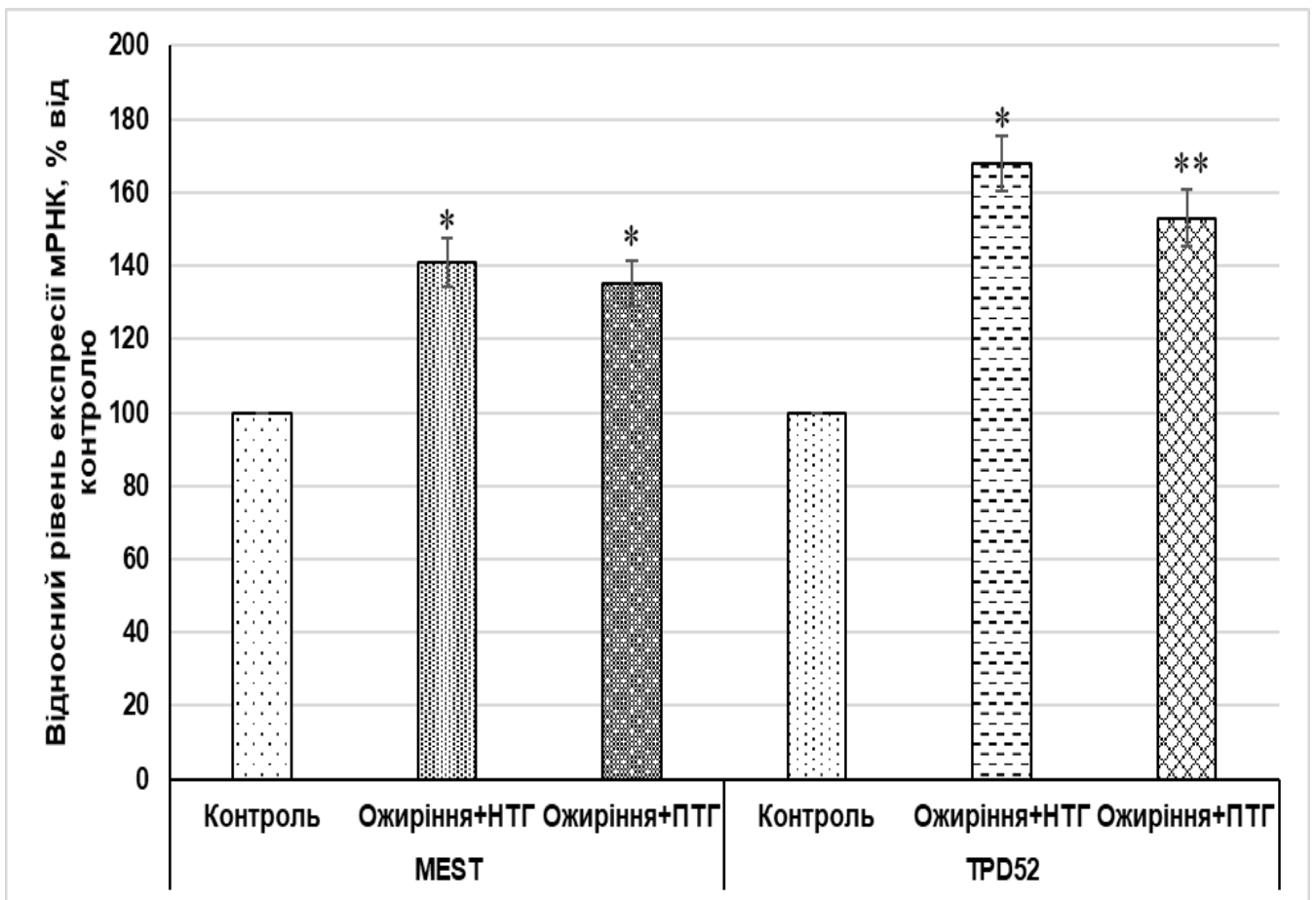
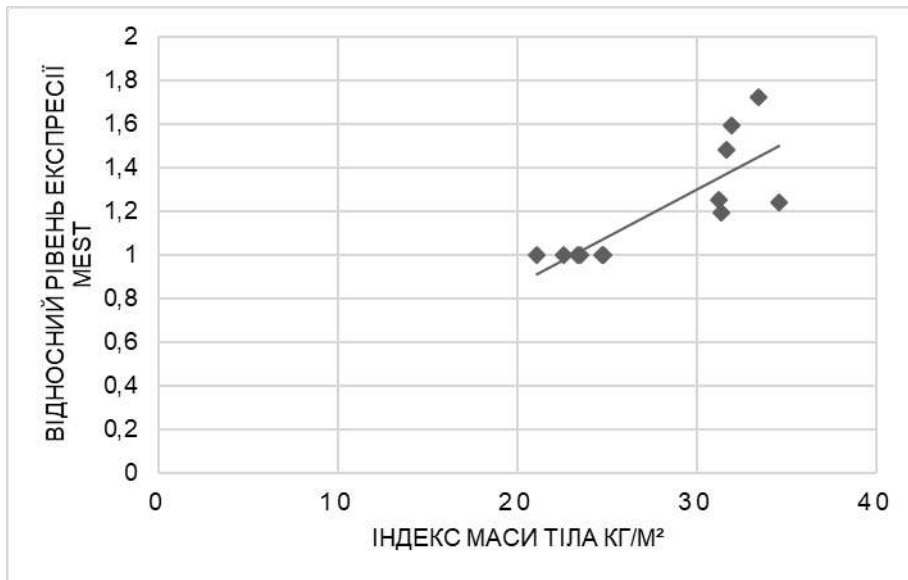


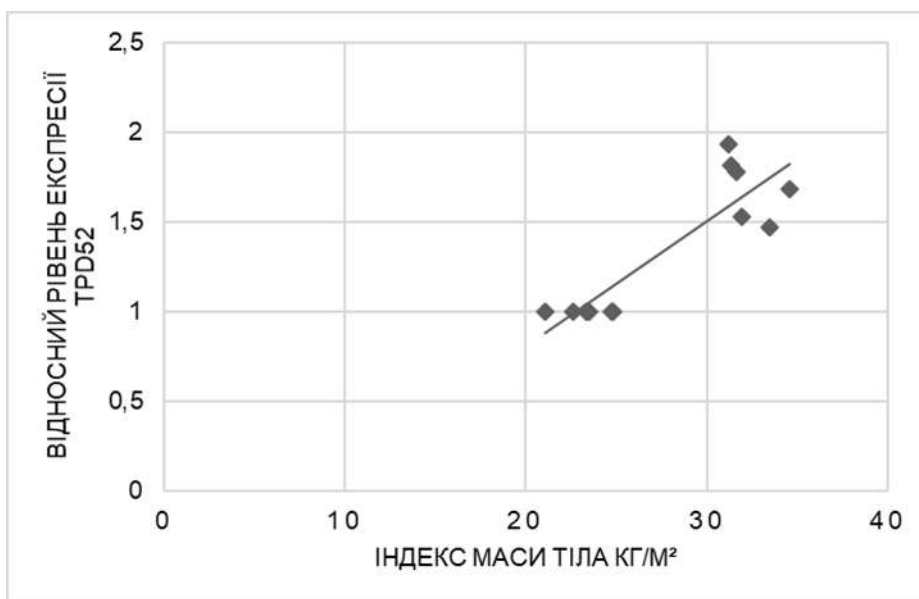
Рис. 3.23. Відносний рівень експресії генів *MEST* та *TPD52* у підшкірній жировій тканині чоловіків без ознак ожиріння (Контроль), а також осіб з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози (Ожиріння+НТГ) та ожирінням, ускладненим порушеною толерантністю до глюкози (Ожиріння+ПТГ).

*Примітки:* величину експресії генів *MEST* та *TPD52* нормалізували по експресії бета-актину, причому рівень експресії досліджених генів у контролі був прийнятим за 100%; n=6; \* -  $P < 0,05$  у порівнянні з контролем; \*\* -  $P < 0,05$  у порівнянні групи з ожирінням й нормальною толерантністю до глюкози

Виявлені зміни в експресії генів *MEST* та *TPD52* за умов ожиріння з нормальною толерантністю до глюкози чітко корелювали з індексом маси тіла у підшкірній жировій тканині:  $r = 0,812937$ ;  $r = 0,884682$  відповідно (рис.3.24).



А

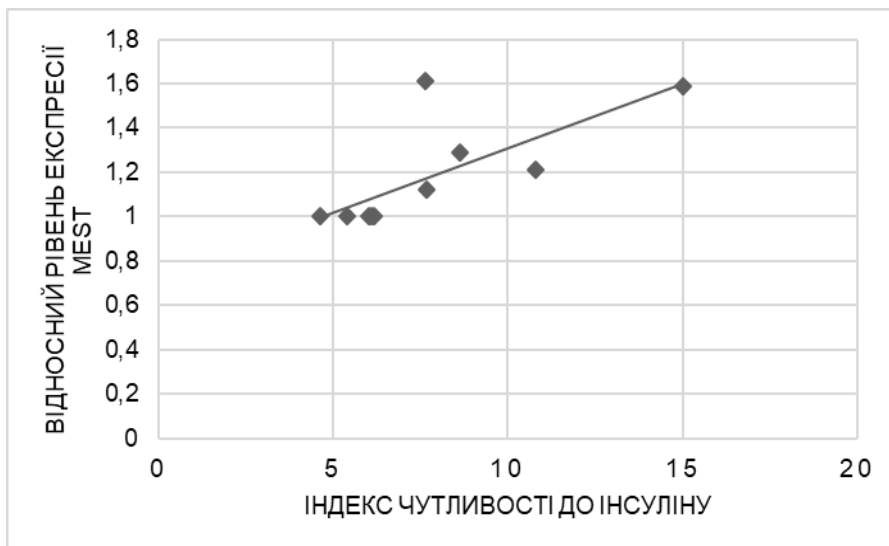


Б

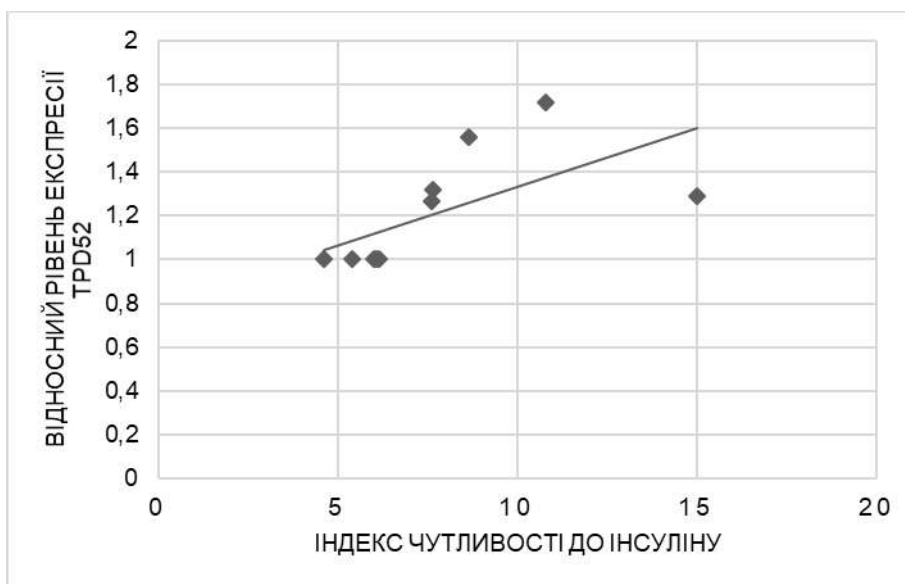
Рис. 3.24. Кореляція між змінами в експресії генів *MEST* (А) та *TPD52* (Б) у підшкірній жировій тканині чоловіків за умов ожиріння і нормальної толерантності до глюкози та індексом маси тіла.



Досліджено, що є чітка кореляційна залежність між змінами в експресії генів *MEST* і *TPD52* за умов ожиріння з порушеною толерантністю до глюкози та індексом чутливості до інсуліну:  $r = 0,737761$ ;  $r = 0,629989$  відповідно (рис. 3.25).



А



Б

Рис. 3.25. Кореляційна залежність між змінами в експресії генів *MEST* (А) та *TPD52* (Б) у підшкірній жировій тканині за умов ожиріння, ускладненим порушеною толерантністю до глюкози та індексом чутливості до інсуліну.

В той же час, незначні зміни у експресії мРНК *MEST* спостерігаються у чоловіків з ожирінням, ускладненим порушеною толерантністю до глюкози порівняно з групою осіб з ожирінням й нормальною толерантністю до глюкози. Однак, у осіб зі зниженою чутливістю до інсуліну на 12% знижується рівень експресії гена *TPD52* порівняно з групою чоловіків з ожирінням, але залишається збільшеним порівняно з контролем.

Ми також показали, що ожиріння впливає на експресію різних генів, які кодують інтегрини у підшкірній жировій тканині (рис. 3.26).

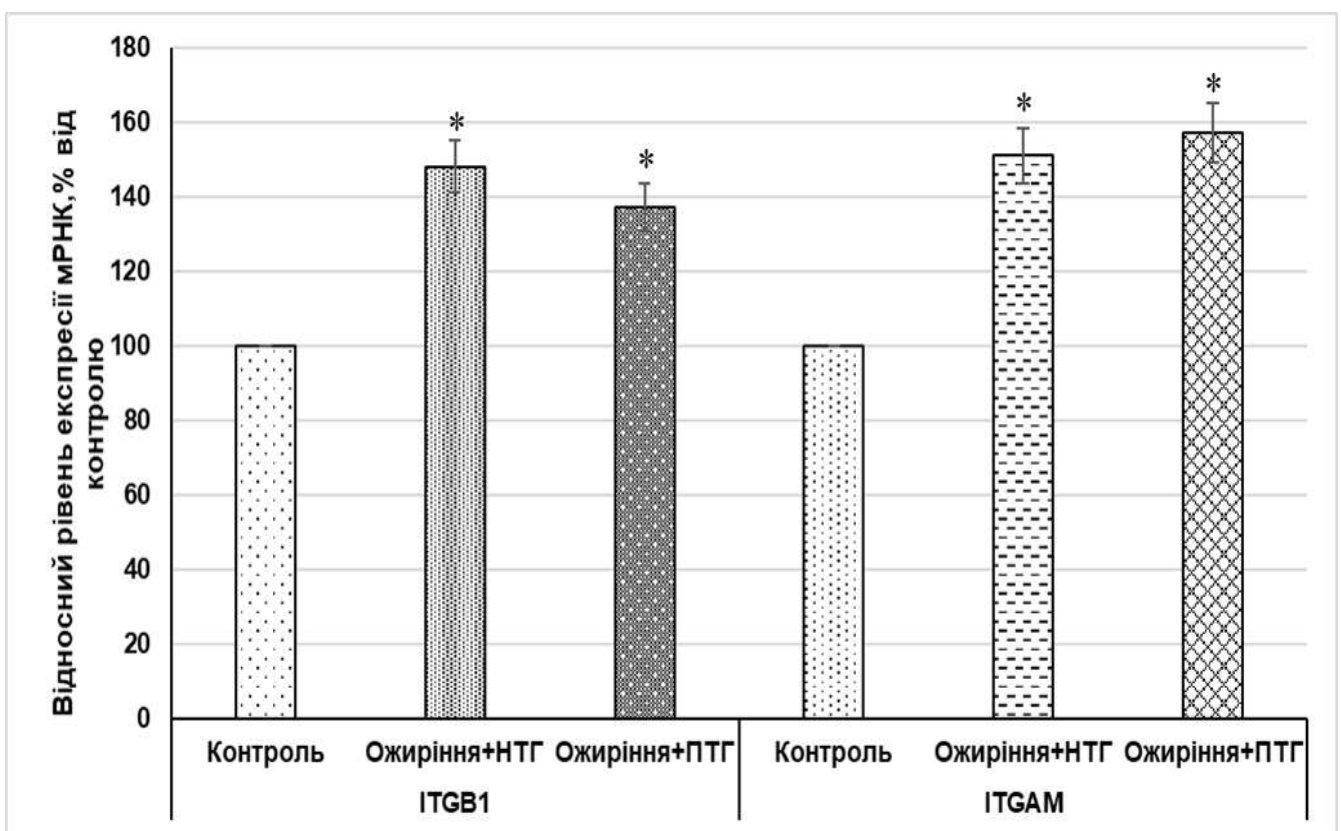


Рис. 3.26. Відносний рівень експресії генів *ITGB1* та *ITGAM* у підшкірній жировій тканині чоловіків без ознак ожиріння (Контроль), а також осіб з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози (Ожиріння+НТГ) та ожирінням, ускладненим порушеною толерантністю до глюкози (Ожиріння+ПТГ).

*Примітки:* величину експресії генів *ITGB1* та *ITGAM* нормалізували по експресії бета-актину, причому рівень експресії досліджених генів у контролі був прийнятим за 100%; n=6; \* -  $P < 0,05$  у порівнянні з контролем.

Так, у чоловіків з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози зростає на 48% рівень експресії гена *ITGB1* і на 51% рівень експресії мРНК *ITGAM* порівняно з худими особами. У той час, за резистентності до інсуліну спостерігаємо не значні зміни в експресії генів *ITGB1* й *ITGAM* порівняно з групою чоловіків з ожирінням й нормальною толерантністю до глюкози, але експресія даних генів за порушеної чутливості до інсуліну значно підвищена порівняно з худими особами (рис. 3.26).

Як видно із даних, приведених на рис. 3.27. рівень експресії генів: *FAT1*, *PPDHF*, *SFRP4*, *CTHRC1* та *EGFL6*, що задіяні у процесі проліферації, у підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози суттєво збільшуються порівняно з худими особами за даними кількісної полімеразної ланцюгової реакції. Так, рівень експресії генів *FAT1*, *PPDHF* та *CTHRC1* у за ожиріння у підшкірній жировій тканині збільшувався порівняно з контрольною групою чоловіків на 72%, 51% та 151% відповідно, а рівень експресії генів *SFRP4* і *EGFL6* підвищувався відповідно в 4 та 11,5 разів.

Рис. 3.28. демонструє, що рівень експресії генів *FAT1* та *PPDPF* у підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням, ускладненим порушеною толерантністю до глюкози, порівняно з жировою тканиною осіб чоловічої статі, що мали ожиріння з нормальною толерантністю до глюкози істотно не змінювався. В той же час, рівень експресії генів *CTHRC1* та *EGFL6* у підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням і порушеною толерантністю до глюкози знижувався на 32% і 63%, відповідно, порівняно з особами, що мали ожиріння і нормальну толерантність до глюкози, а рівень експресії гена *SFRP4*, навпаки, збільшувався на 24%.

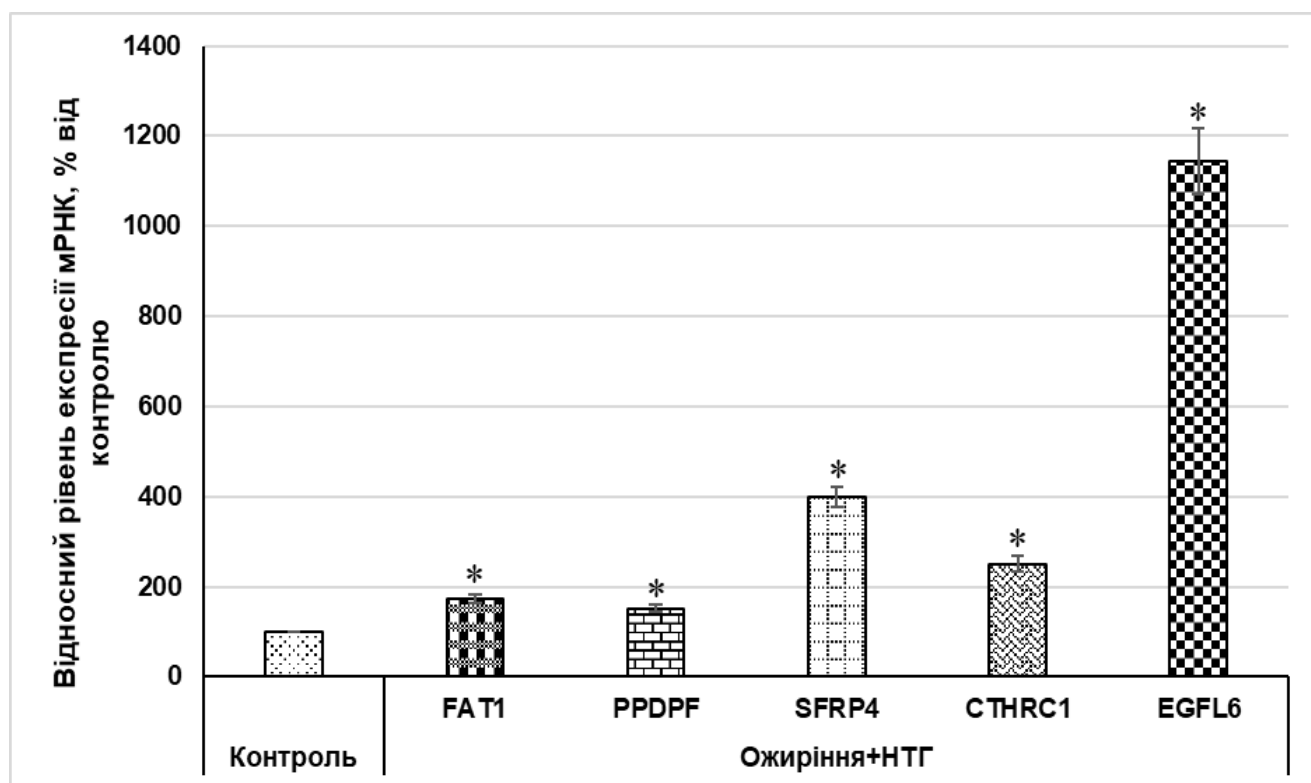


Рис. 3.27. Відносний рівень експресії генів *FAT1*, *PPDPF*, *SFRP4*, *CTHRC1* та *EGFL6* у підшкірній жировій тканині чоловіків без ознак ожиріння (Контроль), а також осіб з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози (Ожиріння+НТГ).

*Примітки:* Величину експресії генів *FAT1*, *PPDPF*, *SFRP4*, *CTHRC1* та *EGFL6* нормалізували по експресії бета-актину, причому рівень експресії досліджених генів у контролі був прийнятим за 100%; n=6; \* - P < 0,05 у порівнянні з контролем.

На рис. 3.29. наведено дані щодо експресії мРНК TLR2 та TLR4 у підшкірній жировій тканині чоловіків, з яких видно, що у групи чоловіків з ожирінням й нормальною толерантністю до глюкози рівень експресії гена *TLR2* на 12% збільшується порівняно з контролем, а рівень експресії *TLR4* навпаки, знижується на 17% порівняно з контролем. Розвиток резистентності до інсуліну у чоловіків з ожирінням підвищує рівень експресії гена *TLR2* на 19% порівняно з групою худих чоловіків, але істотно не змінюється порівняно з групою чоловіків з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози. А рівень експресії мРНК TLR4 у чоловіків з ожирінням, ускладненим толерантністю до глюкози навпаки, знижується на 12%

при порівнянні з групою контрольних чоловіків і майже не змінюється з групою чоловіків з ожирінням й нормальною толерантністю до глюкози.

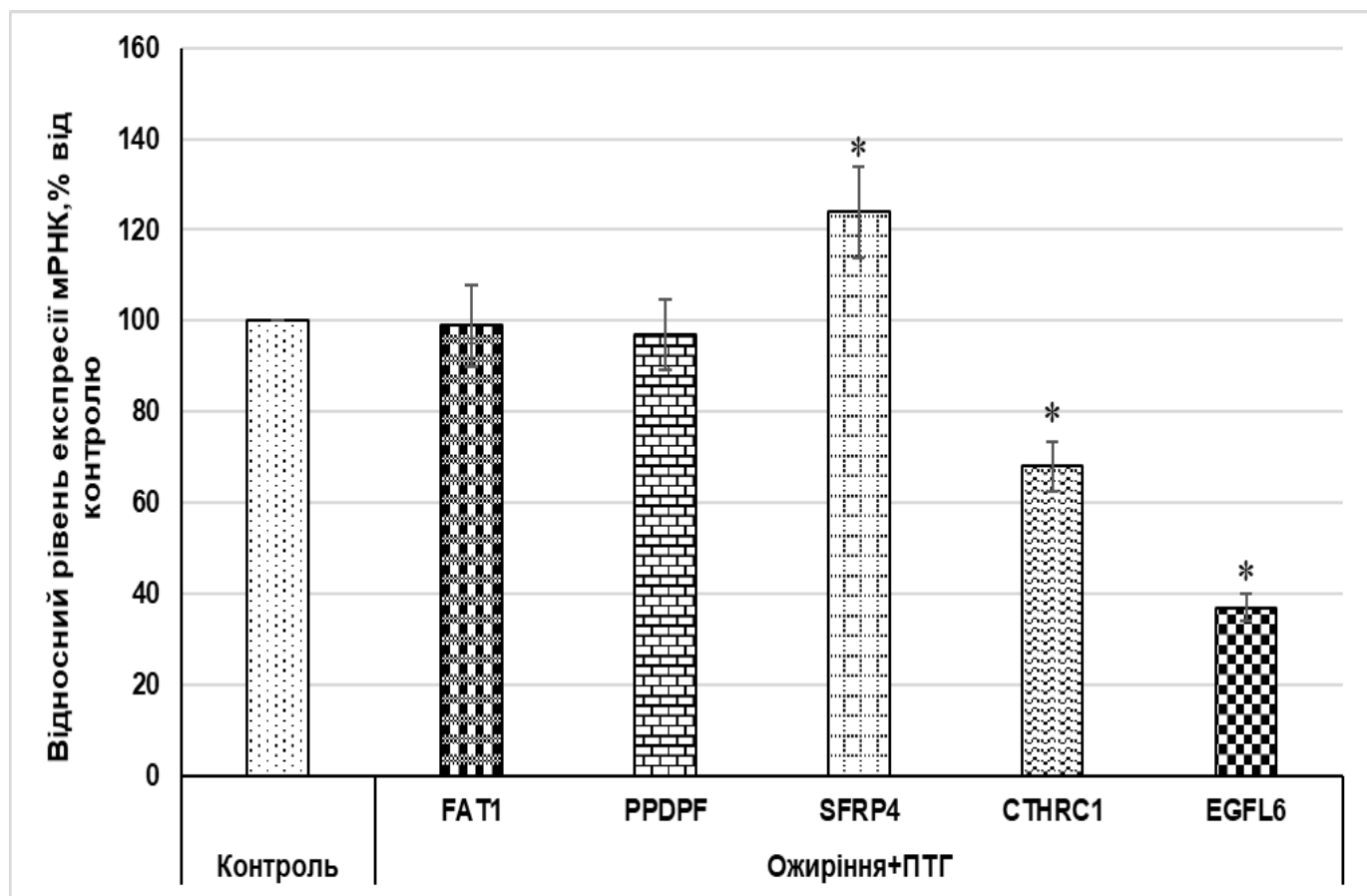


Рис. 3.28. Відносний рівень експресії генів *FAT1*, *PPDPF*, *SFRP4*, *CTHRC1* та *EGFL6* у підшкірній жировій тканині чоловіків без ознак ожиріння (Контроль), а також осіб з ожирінням і порушеною толерантністю до глюкози (Ожиріння+ПТГ).

*Примітки:* величину експресії генів *FAT1*, *PPDPF*, *SFRP4*, *CTHRC1* та *EGFL6* нормалізували по експресії бета-актину, причому рівень експресії досліджених генів у контролі був прийнятим за 100%; n=6; \* - P < 0,05 у порівнянні з контролем.

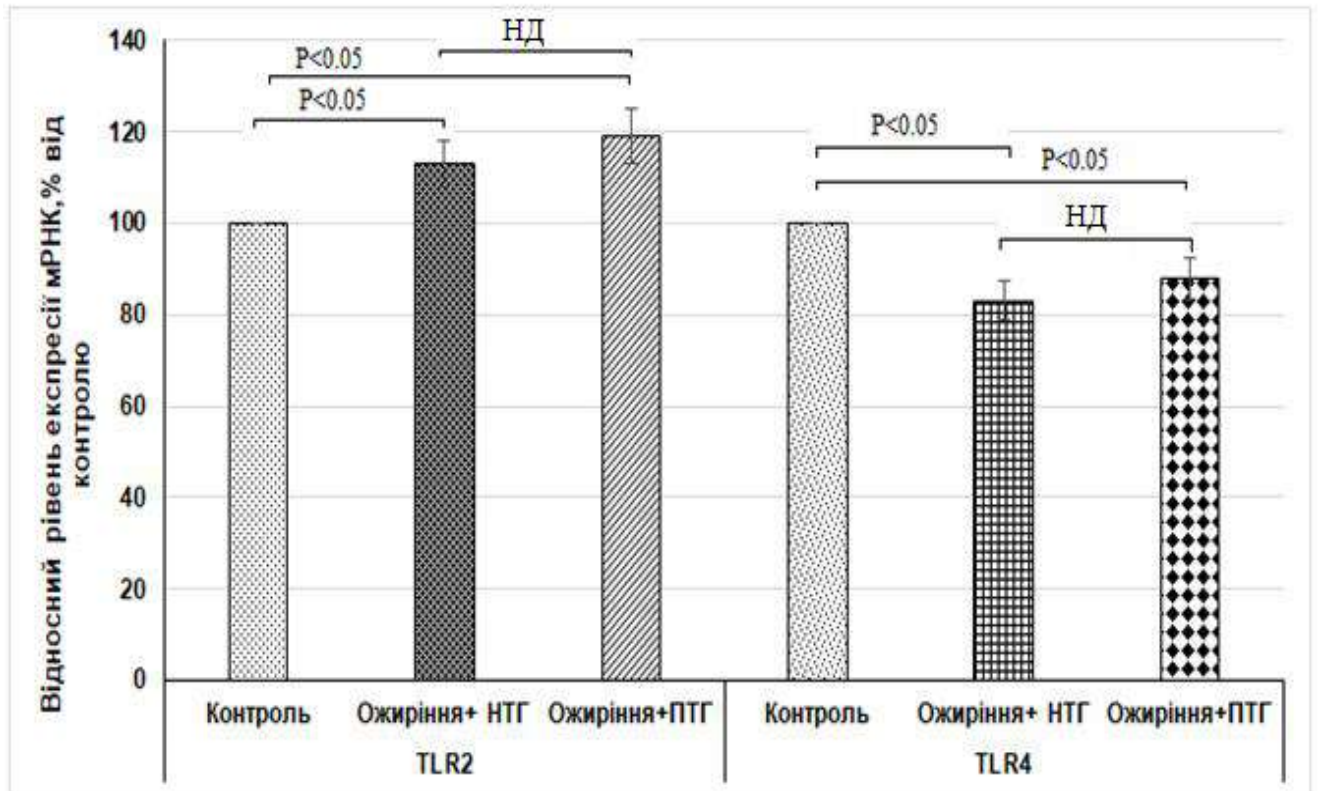


Рис. 3.29. Відносний рівень експресії генів *TLR2* та *TLR4* у підшкірній жировій тканині чоловіків без ознак ожиріння (Контроль), а також осіб з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози (Ожиріння+НТГ) та ожиріння, ускладненим порушеною толерантністю до глюкози (Ожиріння+ПТГ).

*Примітки:* величину експресії генів *TLR2* та *TLR4* нормалізували по експресії бета-актину, причому рівень експресії досліджених генів у контролі був прийнятим за 100%; n = 6.

Нами було показано, що у чоловіків з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози на 134% збільшується рівень експресії гена *TNF* й знижується на 22% рівень *ADD3* порівняно з худими особами, що представлено на рис. 3.30. А за умов резистентності до інсуліну спостерігається ще більше підвищення рівня експресії мРНК *TNF* (+153%) й на 24% зниження рівня експресії гена *ADD3* порівняно з контрольною групою, тобто розвиток резистентності до інсуліну істотно не впливав на експресію гена *ADD3*.

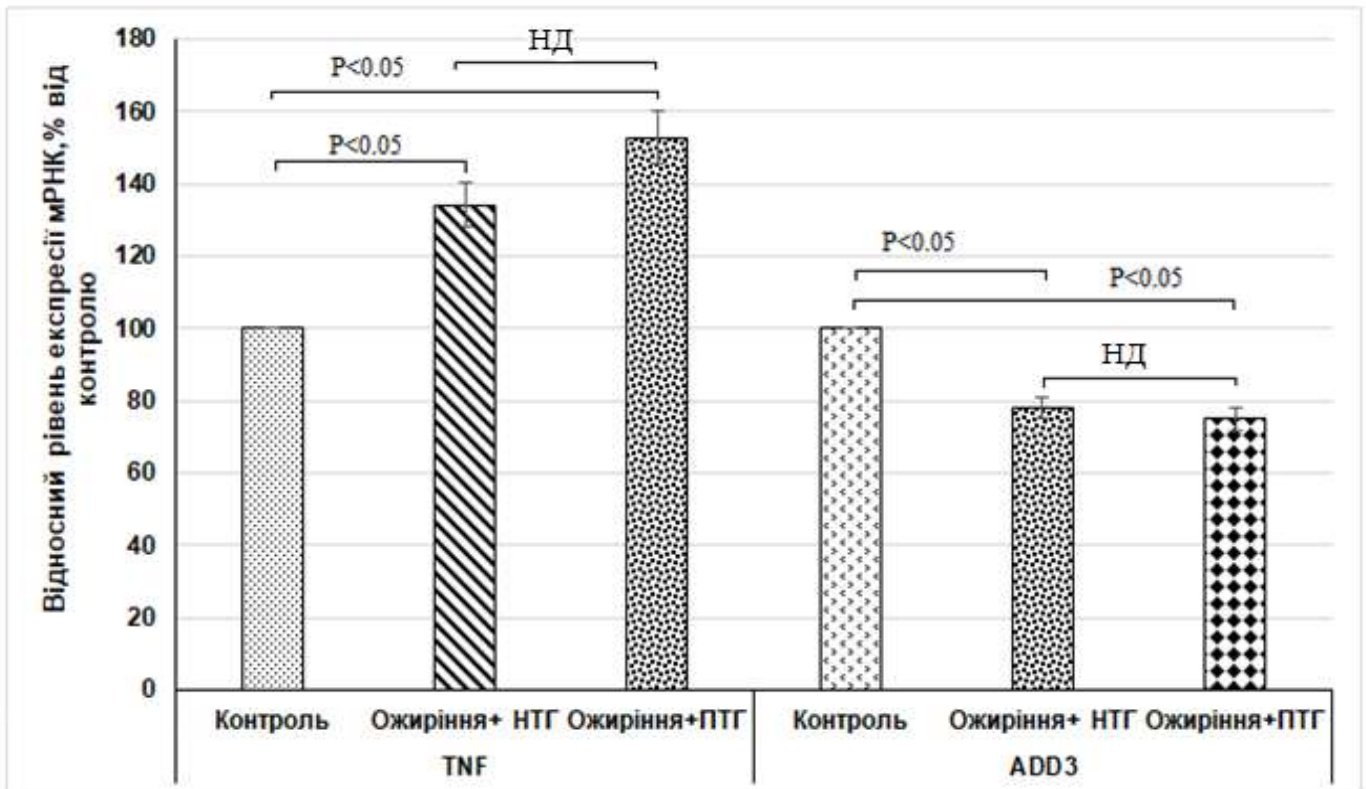


Рис. 3.30. Відносний рівень експресії генів *TNF* та *ADD3* у підшкірній жировій тканині чоловіків без ознак ожиріння (Контроль), а також осіб з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози (Ожиріння+НТГ) та ожиріння, ускладненим порушеною толерантністю до глюкози (Ожиріння+ПТГ).

*Примітки:* величину експресії генів *TNF* та *ADD3* нормалізували по експресії бета-актину, причому рівень експресії досліджених генів у контролі був прийнятим за 100%;  $n = 6$ .

Виявлені зміни в експресії гена *TNFA* у підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням й нормальною толерантністю до глюкози чітко корелювали з індексом маси тіла:  $r = 0,770889$  (рис. 3.30) та індексом чутливості до інсуліну:  $r = 0,810303$  (рис. 3.31).

Крім того, було виявлено чітку кореляційну залежність між змінами в експресії гена *TNFA* у підшкірній жировій тканині чоловіків за умов ожиріння, ускладненим порушеною толерантністю до глюкози та індексом чутливості до інсуліну:  $r = 0,810303$  (рис. 3.32).

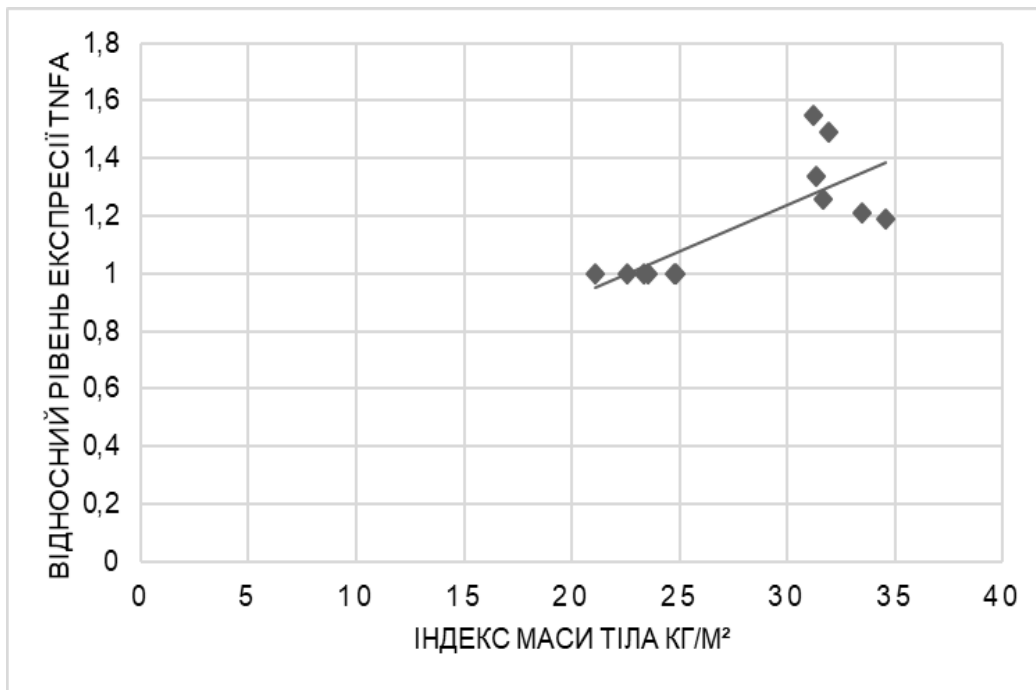


Рис. 3.31. Кореляційна залежність між змінами в експресії гена *TNFA* у підшкірній жировій тканині чоловіків за умов ожиріння і нормальної толерантності до глюкози та індексом маси тіла

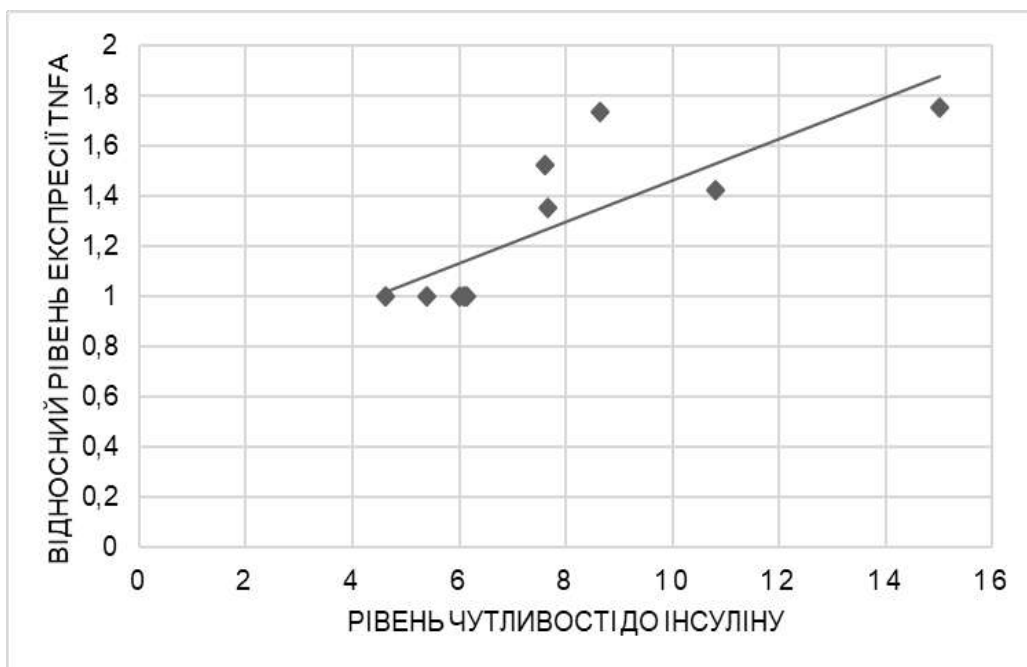


Рис. 3.32. Кореляційна залежність між змінами в експресії гена *TNFA* у підшкірній жировій тканині за ожиріння, ускладненим порушенням толерантності до глюкози, та індексом чутливості до інсуліну.



Важливо відмітити, що характерною детермінантою ожиріння та асоційованої з ним резистентності до інсуліну є стрес ендоплазматичного ретикулума (ER), який є чинником, що контролює експресію великої кількості генів, у тому числі і генів, задіяних у регуляції проліферативних процесів. Він пов'язує між собою ожиріння, дію інсуліну та діабет 2 типу. За умов індукції стресу ендоплазматичного ретикулума підвищується рівень експресії шаперона *BIP*, який причетний до формування третинної структури протеїнів. Відомо, що *BIP* значною мірою контролює активність сенсорно-сигнальних шляхів цього стресу і причетний до розвитку метаболічного синдрому. Тому нам було важливо дослідити рівень експресії гена *BIP*, який функціонує як негативний регулятор усіх трьох сенсорно-сигнальних шляхів стресу ER.

На рис. 3.33. показано, що рівень експресії гена *BIP* підвищується у чоловіків з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози порівняно з контролем, але розвиток резистентності до інсуліну істотно не впливає на експресію даного гена. Отримані нами результати вказують на розвиток стресу ендоплазматичного ретикулума за умов ожиріння.

Проведеними дослідженнями також встановлено, що між зміною експресії мРНК *BIP* у підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози та індексом маси тіла є чітка позитивна кореляція:  $r = 0,885317$  (рис. 3. 34).

В той же час, встановлено чітку кореляційну залежність між змінами в експресії гена *BIP* у підшкірній жировій тканині чоловіків за умов ожиріння і порушеною толерантністю до глюкози та індексом чутливості до інсуліну:  $r = 0,726938$  (рис.3.35).

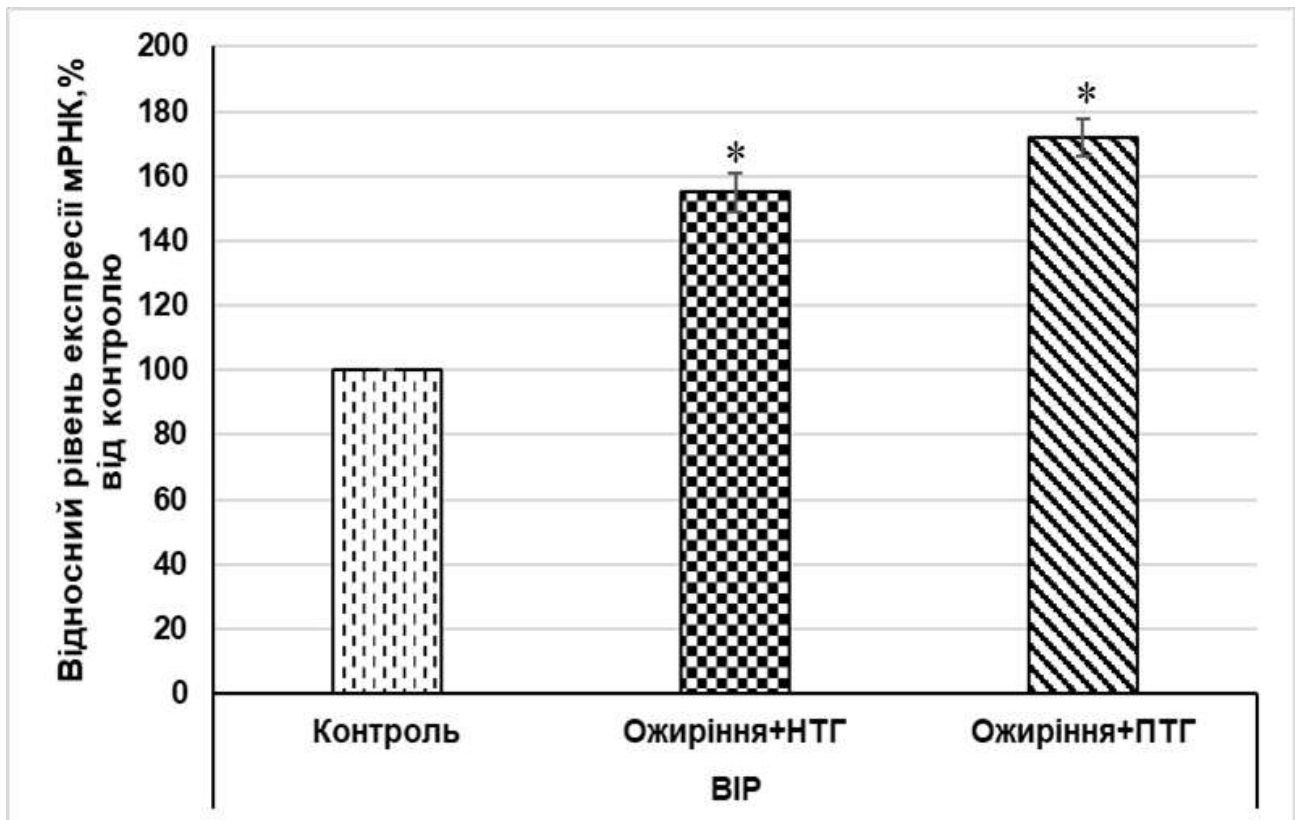


Рис. 3.33. Відносний рівень експресії гена *BIP* (*HSPA5*; *GRP78*) у підшкірній жировій тканині чоловіків без ознак ожиріння (Контроль), а також осіб з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози (Ожиріння+НТГ) та ожиріння, ускладненим порушеною толерантністю до глюкози (Ожиріння+ПТГ).

*Примітки:* величину експресії гена *BIP* нормалізували по експресії бета-актину, причому рівень експресії досліджених генів у контролі був прийнятим за 100%; n=6; \* -  $P < 0,05$  у порівнянні з контролем.

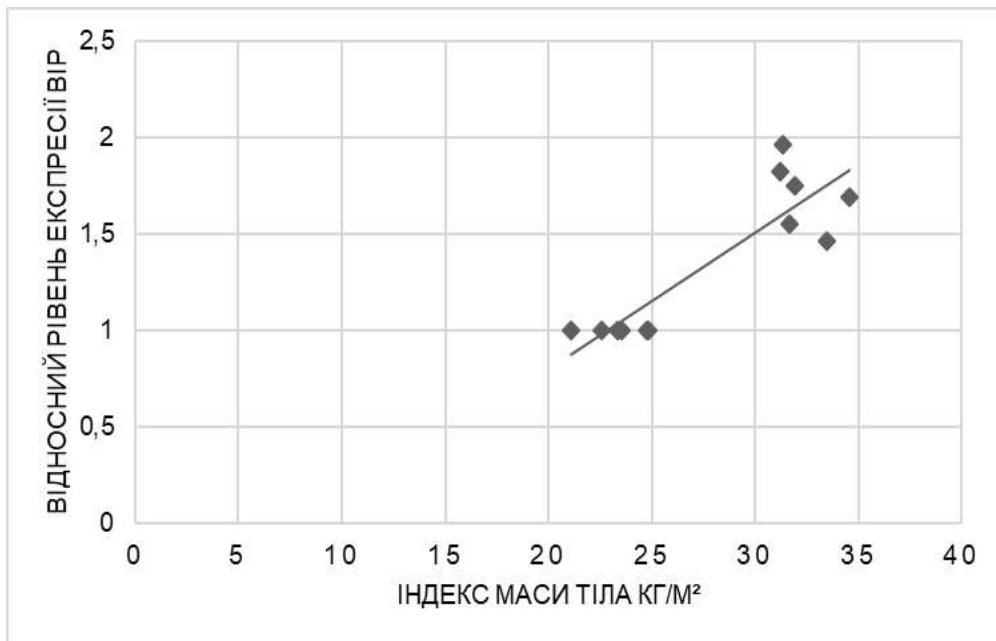


Рис. 3.34. Кореляційна залежність між змінами в експресії гена *VIP* у підшкірній жировій тканині чоловіків за умов ожиріння і нормальної толерантності до глюкози та індексом маси тіла

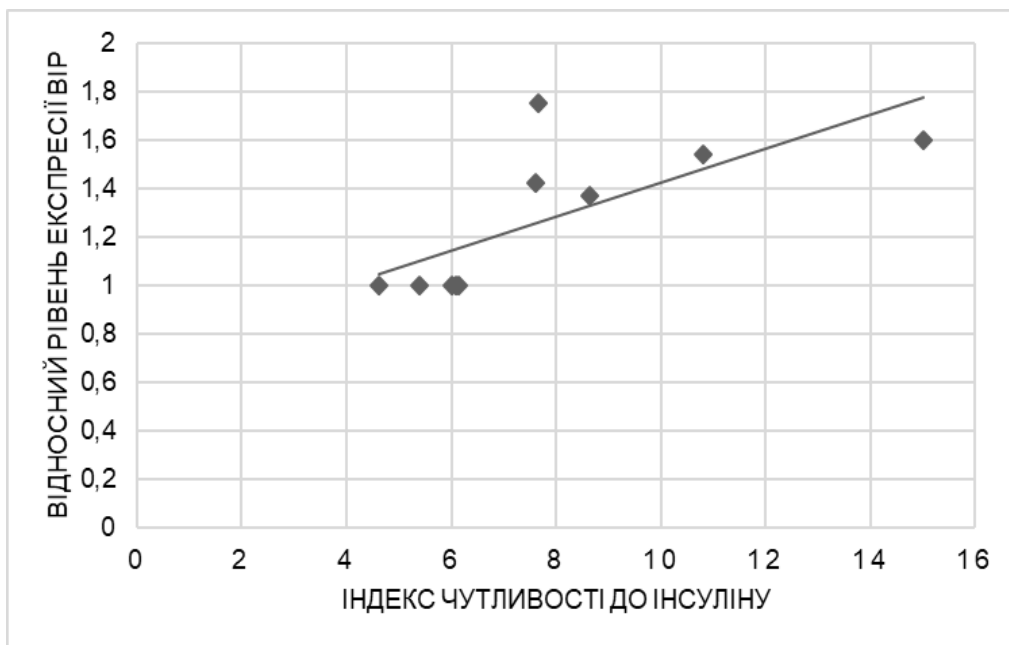


Рис. 3.35. Кореляційна залежність між зміною експресії гена *VIP* у підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням і порушеною толерантністю до глюкози та індексом чутливості до інсуліну

На рис. 3.36. продемонстровано результати дослідження відносного рівня експресії гена *ADM* у підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням і без ознак резистентності до інсуліну свідчать про те, що експресія дослідженого гена у підшкірній жировій тканині істотно збільшується за умов ожиріння і вказує на його можливу участь у розвитку ожиріння та пов'язаних з ним метаболічних ускладнень

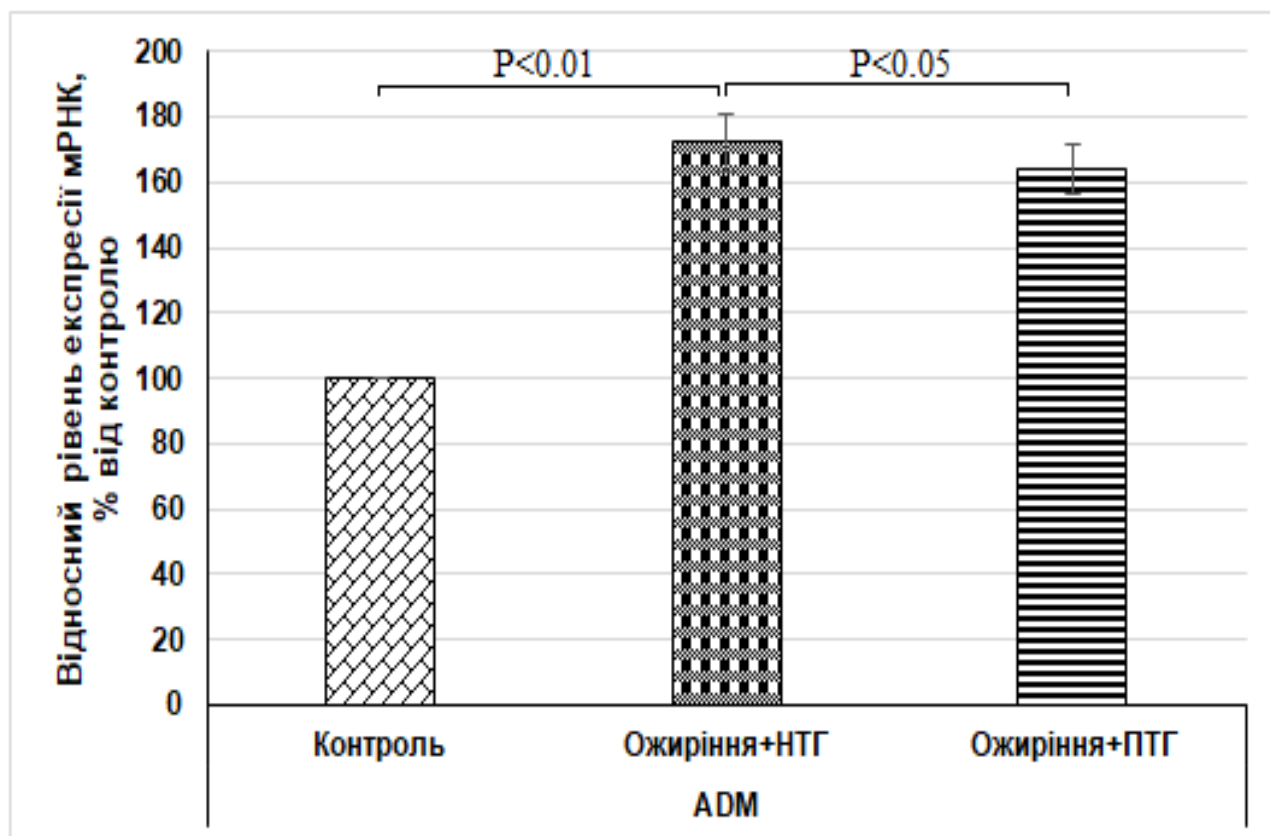


Рис. 3.36. Відносний рівень експресії гена *ADM* у підшкірній жировій тканині чоловіків без ознак ожиріння (Контроль), а також осіб з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози (Ожиріння+НТГ) та ожиріння, ускладненим порушеною толерантністю до глюкози (Ожиріння+ПТГ).

*Примітки:* величину експресії гена *ADM* нормалізували по експресії бета-актину, причому рівень експресії досліджених генів у контролі був прийнятим за 100%; n=6;

Таким чином, проведені нами дослідження по вивченню експресії важливих генів, які відповідають за регуляцію проліферації, ангиогенезу, а також метаболізму глюкози свідчать про наявність змін у рівнях експресії генів підшкірної жирової тканини у двох груп чоловіків: за ожиріння й нормальної толерантності до глюкози, а також за умов резистентності до інсуліну у деяких із цих генів.

#### **3.4. Експресія мікроРНК у підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози.**

У регуляції експресії генів важливу роль відіграють мікроРНК, які з високою специфічністю зв'язуються з 3'- послідовностями мРНК та ініціюють їх деградацію. В зв'язку з цим, нами проведено біоінформаційний аналіз послідовностей мРНК досліджених генів на наявність в їх 3'-структурах можливих сайтів зв'язування мікроРНК (miR-7b, miR-19a, miR-21, miR-143, miR-145 та miR-190) в програмі "TargetScanHuman, Prediction of microRNA targets". Як видно із даних, представлених на рис. 3.36, біоінформаційний аналіз показав наявність сайтів зв'язування мікроРНК miR-145 в 3'- послідовності мРНК SERPINE1 (Serpin Family E Member 1 (PAI-1, Plasminogen Activator Inhibitor 1), а miR-190 – в мРНК EGFL6 (Epidermal Growth Factor-Like Domain Multiple 6). Крім того, специфічні сайти зв'язування були виявлені в 3'- послідовностях мРНК PTEN (Phosphatase And Tensin Homolog, відома ще як Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate 3-Phosphatase And Dual-Specificity Protein Phosphatase PTEN) та ITGAM для мікроРНК miR-19a і miR-21, відповідно, а для мікроРНК miR-143 – одразу в трьох, досліджених нами мРНК: PLAU (Plasminogen Activator, Urokinase), PLAUR (Plasminogen Activator, Urokinase Receptor) та TLR2 (Toll Like Receptor 2). А біоінформаційний аналіз 3'- послідовності мРНК для collagen triple helix repeat containing 1 (CTHRC1) показав наявність сайтів зв'язування для мікроРНК miR-7b (let-7) (рис. 3.37).

Position 32-38 of SERPINE1 3' UTR	5' ...CUUCAUCUGGGACAAAACUGGAG...
<a href="#">hsa-miR-145</a>	3' UCCCUAAGGACCCUU--UUGACCUG
Position 175-181 of EGFL6 3' UTR	5' ...AUUUGCUUUAAAUAUCAUAUCAC...
<a href="#">hsa-miR-190</a>	3' UGGAUUAUAUAGUUUGUAUAGU
Position 411-417 of PTEN 3' UTR	5' ...CACATCCTACCCCUUUGCACU...
<a href="#">hsa-miR-19a</a>	3' AGUCAAAACGUACCUA AACGUGU
Position 731-737 of ITGAM 3' UTR	5' ...UAAUUUUUUGGAUGGAUAAGCUU...
<a href="#">hsa-miR-21</a>	3' AGUUGUAGUCAGACUAUUCGAU
Position 64-70 of PLAU 3' UTR	5' ...AUUUUUGCAGUAGAGUCAUCUCC...
<a href="#">hsa-miR-143</a>	3' CUCGAUGUCACGA-AGUAGAGU
Position 35-41 of PLAUR 3' UTR	5' ...CCCAGAUGUUUCAGCCAUCUCAG...
<a href="#">hsa-miR-143</a>	3' CUCGAUGUCACGAAGUAGAGU
Position 391-397 of TLR2 3' UTR	5' ...CCUGUAUACUUUAAAUCAUCUCU...
<a href="#">hsa-miR-143</a>	3' CUCGAUGUCACGAAGUAGAGU
Position 20-26 of CTHRC1 3' UTR	5' ...UUUAAUUUUCAUUGCUACCUCU...
<a href="#">hsa-miR-7b</a>	3' UUGGUGUGUUGGAUGAUGGAGU

Рис. 3.37. Сайти зв'язування мікроРНК miR-7b, miR-19a, miR-21, miR-143, miR-145 та miR-190 з 3'-послідовностями мРНК SERPINE1, EGFL6, PTEN, ITGAM, PLAU, PLAUR, TLR2 та CTHRC1 за даними біоінформаційного аналізу в програмі "TargetScanHuman, Prediction of microRNA targets"

([http://www.targetscan.org/vert\\_50](http://www.targetscan.org/vert_50)).

У зв'язку з цим, ми провели дослідження по вивченню рівня експресії мікроРНК miR-7b, miR-19a, miR-21, miR-143, miR-145, miR-190 та miR-7b у підшкірній жировій тканині чоловіків без ознак ожиріння (контрольна група), а також в осіб з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози для виявлення можливих механізмів регуляції експресії генів *SERPINE1*, *EGFL6*, *PTEN*, *ITGAM*, *PLAU*, *PLAUR*, *TLR2* та *CTHRC1* за умов ожиріння.

Нами було показано, що у чоловіків з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози знижується на 65 % рівень експресії мікроРНК miR-7b й підвищується на 22 % рівень експресії мікроРНК miR-19a порівняно з худими особами, що показано на рис. 3.38.

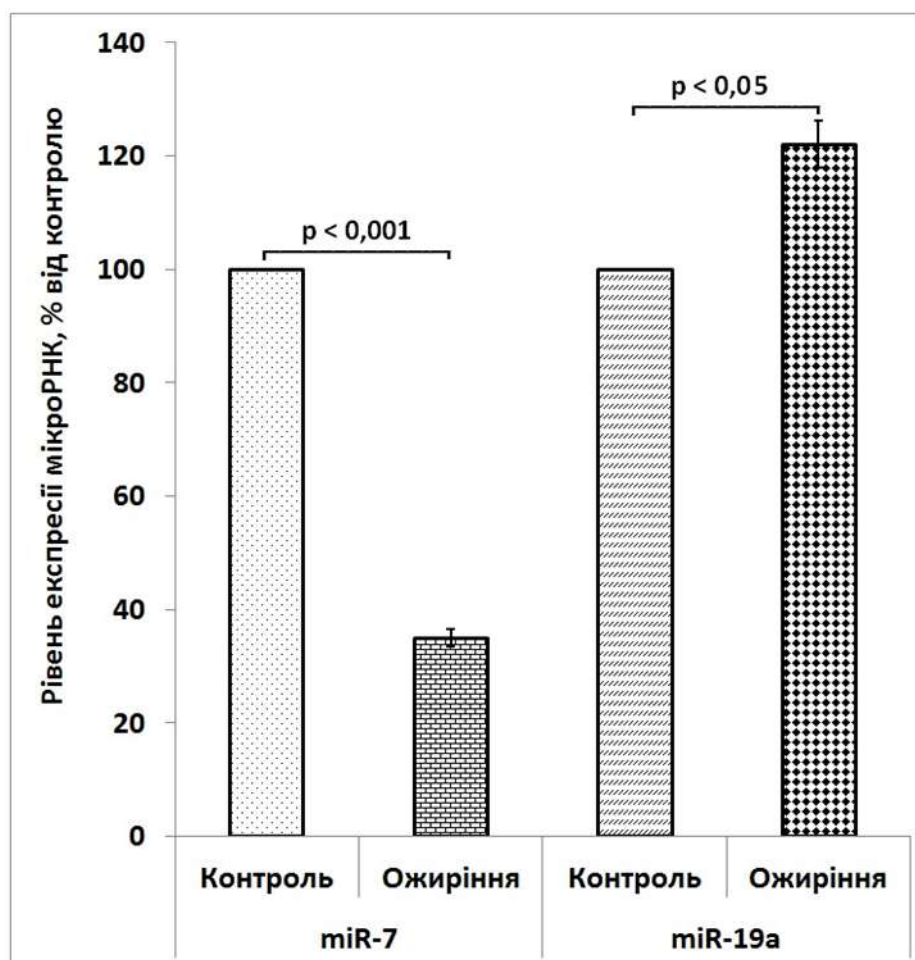


Рис. 3.38. Відносний рівень експресії мікроРНК miR-7b та miR-19a у підшкірній жировій тканині чоловіків без ознак ожиріння (Контроль), а також осіб з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози (Ожиріння).

*Примітки:* величину експресії мікроРНК miR-7b і miR-19a нормалізували по експресії бета-актину, причому рівень експресії досліджених генів у контролі був прийнятим за 100%; n=6;

Як видно із даних, приведених на рис. 3.39, рівень експресії мікроРНК miR-21 і miR-190 знижується відповідно на (88 % та 44 %) порівняно з групою чоловіків без ожиріння (Контроль).

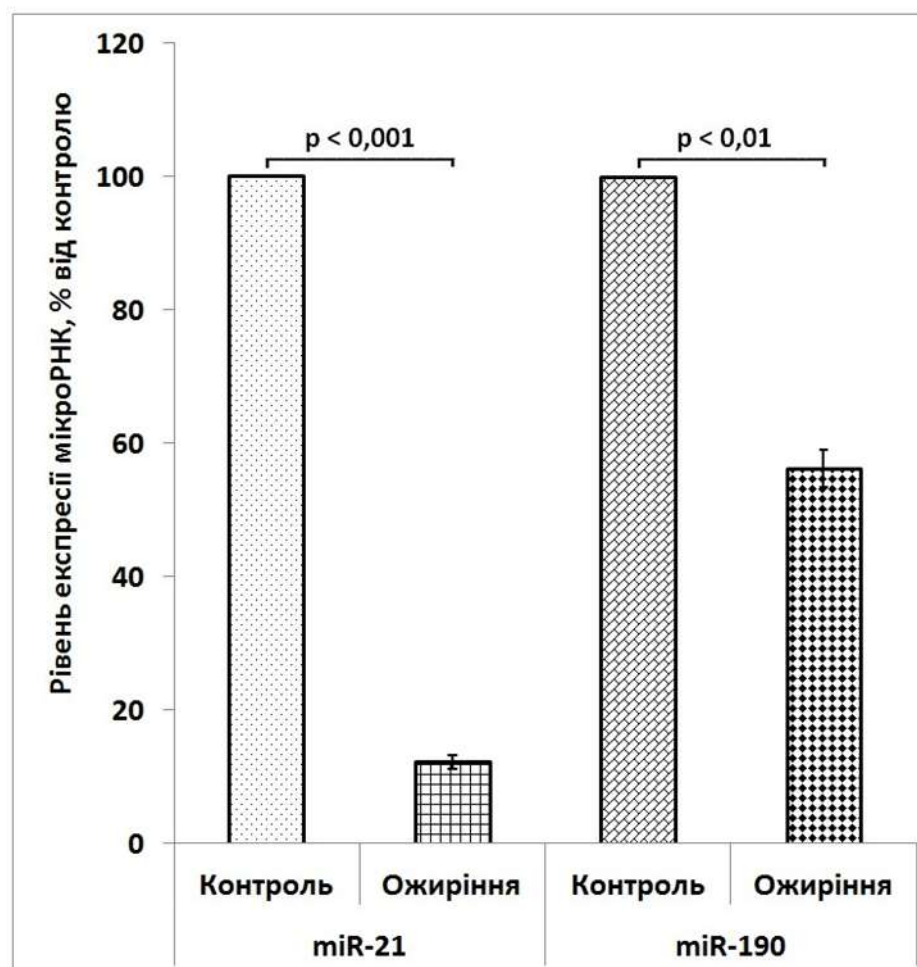


Рис. 3.39. Рівень експресії мікроРНК miR-21 та miR-190 у підшкірній жировій тканині чоловіків без ознак ожиріння (Контроль), а також в осіб з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози (Ожиріння).

*Примітки:* величину експресії мікроРНК miR-21 і miR-190 нормалізували по експресії бета-актину, причому рівень експресії досліджених генів у контролі був прийнятим за 100%; n=6;

Ми досліджували рівень експресії мікроРНК miR-143 та miR-145 у підшкірній жировій тканині чоловіків і показали, що в групі чоловіків з ожирінням і



нормальною толерантністю до глюкози спостерігається знижений на 91 % рівень експресії мікроРНК miR-143 і на 69 % miR-145 порівняно з контрольною групою (рис.3.40).

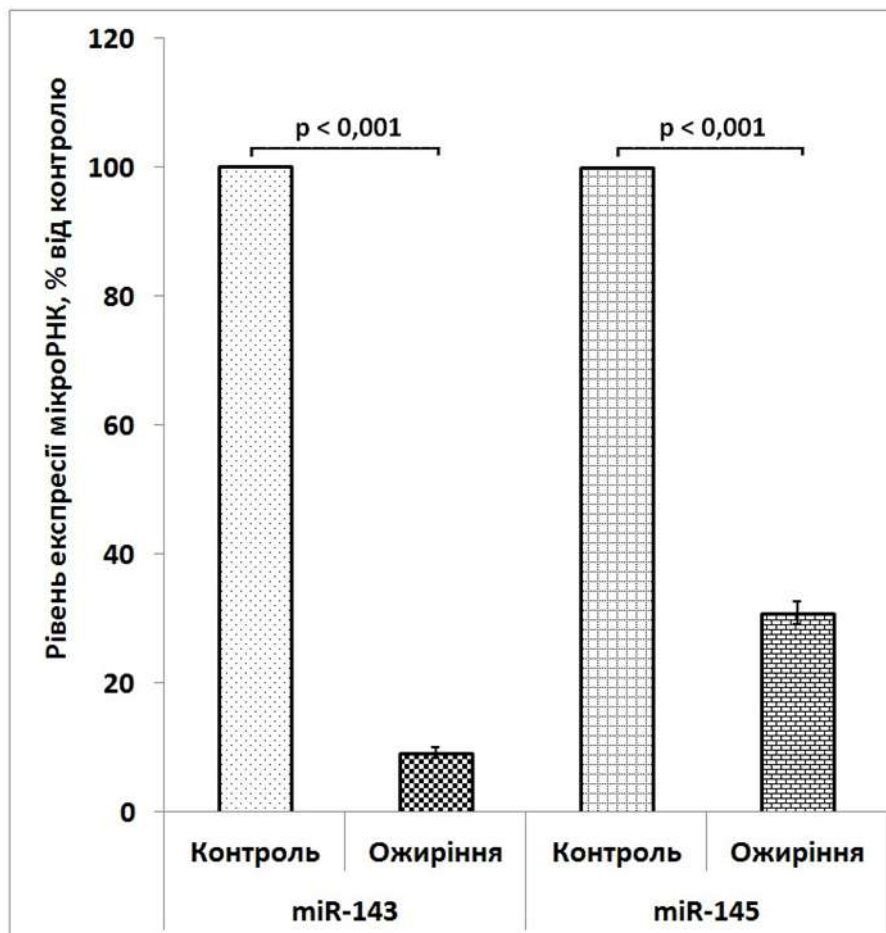


Рис. 3.40. Рівень експресії мікроРНК miR-143 та miR-145 у підшкірній жировій тканині чоловіків без ознак ожиріння (Контроль), а також в осіб з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози (Ожиріння).

*Примітки:* величину експресії мікроРНК miR-143 і miR-145 нормалізували по експресії бета-актину, причому рівень експресії досліджених генів у контролі був прийнятим за 100%; n=6;

## РОЗДІЛ 4. ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Адипоцити підшкірної жирової тканини відіграють істотну роль у розвитку порушення толерантності до глюкози, оскільки більш чутливі до антиліполітичних ефектів інсуліну порівняно із вісцеральною жировою тканиною [156]. Резистентність до інсуліну характеризується порушенням здатності інсуліну пригнічувати вихід глюкози з печінки і підтримування поглинання глюкози жировою і м'язовою тканинами. Таким чином, резистентність до інсуліну є ключовою ланкою між накопиченням жиру жировою тканиною і цукровим діабетом 2 типу. Саме тому така важлива роль підшкірної жирової тканини у метаболізмі глюкози і ліпідів.

Порушення метаболізму може призводити до змін у функціонуванні регуляторних механізмів на різних рівнях. Відомо, що ліполіз, адіпогенез, ангиогенез, а також проліферативні процеси контролюються сіткою транскрипційних та інших регуляторних факторів. У цій роботі проведені дослідження експресії генів великої групи функціонально різних протеїнів, які беруть участь у регуляції клітинного циклу, проліферативних процесів, ангиогенезу, виживання клітин, їх міграції та міжклітинних взаємодій, а також генів, які контролюють сигнальні шляхи клітини.

### **4.1. Вплив ожиріння на експресію генів, які контролюють процеси ангиогенезу у підшкірній жировій тканині**

Ожиріння – це гетерогенне захворювання, яке за рахунок взаємодії біологічних, поведінкових та екологічних факторів, викликане станом енергетичного дисбалансу, призводить до надмірного накопичення жиру і збільшення маси тіла. Враховуючи той факт, що метаболічний синдром є результатом складних перехресних взаємозв'язків між системами різних органів і сигнальними шляхами в них, не дивно, що ожиріння і резистентність до інсуліну виникають через зміни в різних тканинах, включаючи жирову тканину, м'язи, печінку і гіпоталамус. Цікаво, що порушення обміну речовин характеризуються

також порушеною структурою і функцією судин у цих тканинах. Кровоносні судини підтримують гомеостаз органів шляхом забезпечення транспортування поживних речовин, кисню, паракринних сигналів і факторів згортання крові, а також підтримання судинного тону. Ендотеліальні клітини є високопластичними і легко переходять від “сплячого” стану до ангіогенного для реваскуляризації тканин на вимогу. Гіпертрофія адипоцитів вимагає скоординованого ангіогенезу, який регулюється різними про- та анти-ангіогенними факторами. В той же час, розвиток резистентності до інсуліну за ожиріння суттєво репрограмує у підшкірній жировій тканині експресію частини досліджених генів, зокрема пов'язаних із ангіогенезом, і, можливо, сприяють аберантному ангіогенезу.

Результати цього дослідження чітко показали, що за умов ожиріння рівень всіх досліджених генів (*VEGF-A*, *PDGFC*, *FGF1*, *FGF2*, *FGFR2*, *FGFRL1*, *E2F8*, *HIF1A*, *SERPINE1*, *PLAT*, *PLAU* та *PLAUR*), які кодують ключові, пов'язані з ангіогенезом, фактори, істотно змінюється у підшкірній жировій тканині чоловіків і можливо беруть участь у розвитку ожиріння та його ускладнень, зокрема резистентності до інсуліну.

Наші дослідження показали, що експресія таких про-ангіогенних факторів як *VEGF-A* і особливо його сплайс-варіанту - *VEGF-A-189*, а також *PDGF-C* знижується у чоловіків з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози, що узгоджується з літературними даними [165], у яких продемонстровано, що у людей зі стабільним ожирінням спостерігається знижена експресія ангіогенних генів, зокрема *VEGF-A*, що може бути наслідком зменшення щільності капілярів та кровотоку у підшкірній жировій тканині і також може пояснюватися зниженою інтенсивністю метаболізму або пригніченням ангіогенезу. Але щодо інших про-ангіогенних генів, таких як *FGFR2* та *FGF1*, то нами було показано зростання рівня їх експресії за умов ожиріння, причому підвищений їх рівень може бути причетним до активації процесів проліферації і росту жирової тканини.

Існують дані про те, що підвищений рівень *HIF1A* може підсилювати сигналювання інсуліну у адипоцитах і цим сприяє перетворенню глюкози у жирні кислоти й потім у тригліцериди, що призводить до ожиріння [169,170], але механізм

цього залишається ще не з'ясованим. Ми також проаналізували рівень експресії двох різних HIF-альфа субодиниць (HIF1A та EPAS1) і показали, що за ожиріння підвищується рівень експресії тільки транскрипційного фактора HIF1A, але розвиток резистентності інсуліну на нього істотно не впливає, причому ці результати узгоджуються з літературними даними. Так, Weijts et al [78] продемонстрували, що HIF1A разом з іншими транскрипційними факторами (E2F8 та E2F7) сприяють ангиогенезу шляхом активації транскрипції VEGF-A, причому наші результати виявили підвищений рівень експресії транскрипційного фактора E2F8 за ожиріння у підшкірній жировій тканині.

Згідно літературних даних [171], преадипоцити експресують більше PDGF, ніж адипоцити, але при ожирінні більшість преадипоцитів диференціюються у зрілі адипоцити і, таким чином, кількість преадипоцитів знижується, а рівень PDGF зменшується. Щоб задовольнити попит PDGF у підшкірній жировій тканині гіпоксія індукує експресію PDGF у макрофагах, які вивільняють цей фактор росту [171]. Дослідження, проведені нами, продемонстрували знижений рівень експресії тромбоцитарного фактора росту C за умов ожиріння, що, може пояснюватися зменшеною кількістю преадипоцитів при ожирінні.

Фактор росту FGF1 відіграє важливу роль у регуляції виживання клітин, проліферації адипоцитів, їх поділу, диференціації і міграції. У 2010 р. Mejhert et al. [172] виявили, що FGF1 секретується підшкірною жировою тканиною і його рівень збільшується за умов ожиріння, цим припускаючи, що фактор росту фібробластів 1 може відігравати провідну роль у розростанні жирової тканини і що FGF1 при цьому приймає участь у модуляції чутливості до інсуліну [70]. FGF1 активує кілька сигнальних шляхів, у тому числі АКТ, p38 і p44/42, останній є важливим у FGF1-опосередкованій диференціації адипоцитів, оскільки інгібування цього шляху може знижувати адипогенез [172]. Проведені нами дослідження показали підвищений рівень фактора росту фібробластів 1 як за ожиріння з нормальною толерантністю до глюкози, так і за ожиріння, ускладненим порушеною толерантністю до глюкози, що узгоджуються з літературними даними [69]. Раніше повідомлялося, що FGF2 може функціонувати як негативний, так і позитивний фактор адипогенезу *in vivo*,

регулюючи активацію сигнального шляху ERK [173]. Але більшу регуляторну роль фактор росту фібробластів 2 виконує в ангіогенезі. Ми показали, що при стабільному ожирінні знижується рівень двох потужних ангіогенних факторів: VEGF-A та FGF2, а це відзеркалює зміну ангіогенезу. У чоловіків з ожирінням й нормальною толерантністю до глюкози підвищується також експресія FGFR2, що може мати компенсаторний механізм по відношенню до зниження рівнів VEGF-A і FGF2. А зниження рівня експресії гена іншого рецептора факторів росту фібробластів – FGFR1 за умов ожиріння може нейтралізувати функцію факторів росту фібробластів у забезпечення ростових процесів.

Варто відмітити, що система плазміну відіграє важливу роль у згортанні, фібринолізі, запальному ангіогенезі й ремоделюванні тканин. Існують дані про те, що TNF- $\alpha$  може регулювати експресію активаторів й інгібіторів плазміногену. У дослідях на щурах показано, що TNF- $\alpha$  може сприяти розсмоктуванню тромбу, підвищуючи експресію гена PLAU [174]. Фактор TNF- $\alpha$  може активувати кілька внутрішньоклітинних сигнальних шляхів, включаючи NF- $\kappa$ B та MAPK, причому активація останніх необхідна для регуляції PLAU. Однак, інгібування шляху ERK, але не NF- $\kappa$ B, знижує рівень експресії TNF- $\alpha$  в макрофагах [174]. Ми продемонстрували підвищений рівень урокіназного та тканинного типів активатора плазміногену, а також підвищення рівня TNF- $\alpha$  за умов ожиріння, й одним із можливих механізмів підвищення рівня PLAU є збільшення рівня TNF- $\alpha$  у жировій тканині за ожиріння. Разом з тим, резистентність до інсуліну знижує рівень PLAT, що може вказувати на знижену здатність до розчинення тромбів за умов резистентності до інсуліну та підвищення частоти серцево-судинних ускладнень. Існують докази того, що за ожиріння спостерігається збільшення рівня PLAU і це корелює з підвищеною кількістю накопичення макрофагів у підшкірній жировій тканині, причому зв'язаний з uPA рецептор на поверхні клітин макрофагів відіграє значну роль у деградації позаклітинного матриксу для міграції макрофагів і посиленої клітинної інвазії [90]. У нашій роботі представлені дані про збільшений рівень експресії мРНК PLAU та мРНК TNF, що вказує на можливе підвищення рівня макрофагів у підшкірній жировій тканині і появу про-запального стану.

Ожиріння пов'язане також із підвищеною активністю PAI-1 (SERPINE1), і чим більша маса жирової тканини, тим більший внесок циркулюючого інгібітору активатора плазміногену у розростання жирової тканини. Порушення фібринолізу при ожирінні, ймовірно, обумовлено підвищеною експресією PAI-1 у жировій тканині, тим самим збільшуючи ризик серцево-судинних захворювань. Гіпоксія у жировій тканині може активувати синтез сфінгозин-1 фосфат (S1P) у адипоцитах, який зв'язується з рецепторами S1P2, а S1P2, у свою чергу, потенційно активувати експресію гена PAI-1. S1P – біоактивна сигнальна молекула, що є продуктом розпаду сфінгозину, і яка причетна до регуляції руху клітин, диференціації, ангиогенезу за рахунок зв'язування зі своїми рецепторами [175]. Зазначений факт підтверджує отримані нами дані про підвищений рівень експресії PAI-1 у групі чоловіків з ожирінням, що є ризиком серцево-судинних захворювань.

У таблиці 4.1 та на рис. 4.1 представлені узагальнені дані стосовно змін в експресії генів, задіяних у регуляції ангиогенезу та фібринолізу, в жировій тканині чоловіків з ожирінням.

Таким чином, ці дослідження вказують на те, що за умов стабільного ожиріння в підшкірній жировій тканині чоловіків знижується рівень експресії потужних ангиогенних генів і виражено змінюється експресія також тих генів, які кодують ключові регуляторні компоненти фібринолізу, а це свідчить про порушення процесів ангиогенезу та фібринолітичної системи й можливості розвитку серцево-судинних захворювань.

Так, виявлені нами зміни в експресії генів *VEGF*, *VEGF-A-189* та *FGF2* за умов ожиріння вказують на можливе порушення процесів ангиогенезу в жировій тканині, а підвищення рівня експресії генів *FGF1* та *FGFR2* – на можливі зміни в інтенсивності проліферативних процесів у цій тканині. Більше того, збільшення рівня експресії генів *PLAU*, *PLAUR* та *SERPINE1* можуть бути пов'язані з порушеннями фібринолітичної системи.

*Таблиця 4.1.* Вплив ожиріння на експресію генів *VEGF-A*, *VEGF-A-189*, *FGF1*, *FGF2*, *FGFR2*, *FGFL1*, *HIF1A*, *EPAS1*, *E2F8*, *PDGFC*, *PLAU*, *PLAUR*, *PLAT*,

*SERPINE1* та *TNF*, які кодують фактори, задіяні в регуляції ангіогенезу, процесів проліферації та фібринолізу в жировій тканині.

Гени	Контроль	Ожиріння+НТГ	Ожиріння+ПТГ
VEGF-A	100%	↓ 39%	↑ 34%
VEGF-A-189	100%	↓ 49%	↑ 71%
FGF1	100%	↑ 135%	↑ 27%
FGF2	100%	↓ 36%	↑ 67%
FGFR2	100%	↑ 61%	↓ 20%
FGFL1	100%	↓ 50%	змін немає
HIF1A	100%	↑ 25%	змін немає
EPAS1	100%	змін немає	змін немає
E2F8	100%	↑ 146%	↑ 86%
PDGFC	100%	↓ 17%	змін немає
PLAU	100%	↑ 25%	↑ 43%
PLAUR	100%	↑ 69%	↑ 131%
PLAT	100%	↑ 34%	↓ 20%
SERPINE1	100%	↑ 440%	↑ 621%
TNF	100%	↑ 134%	↑ 153%

Примітки: ↓ - рівень експресії знижується; ↑ - рівень експресії підвищується.

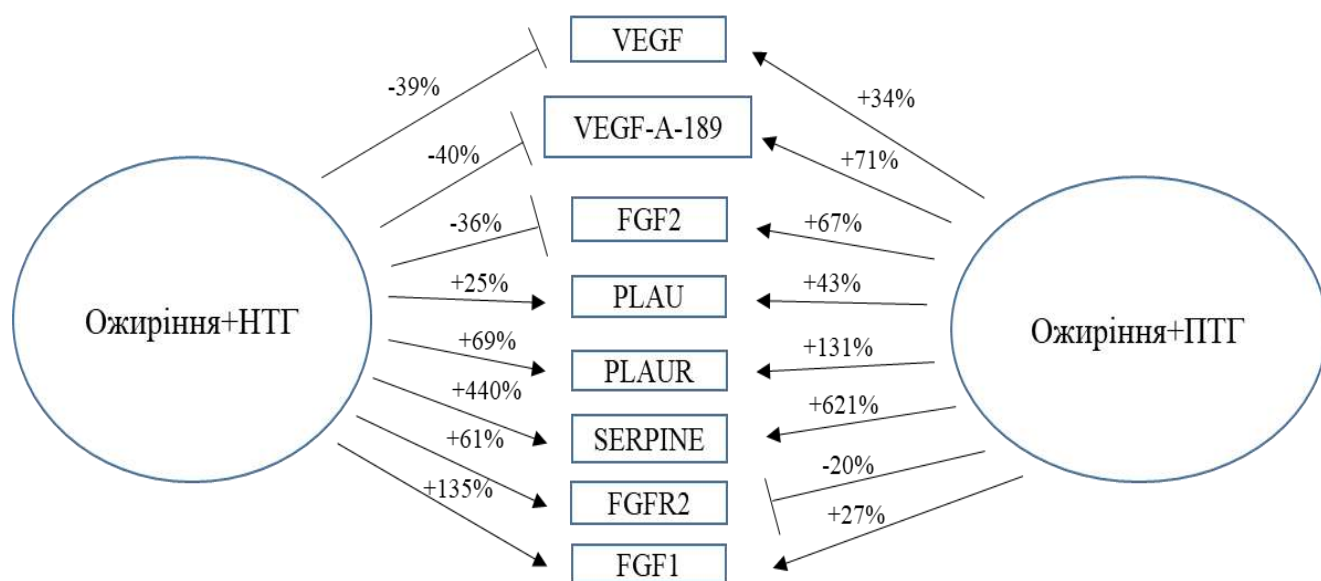


Рис. 4.1. Експресія генів, причетних до регуляції ангіогенезу, процесів проліферації та фібринолізу в підшкірній жировій тканині дорослих чоловіків за

умов ожиріння та ожиріння, ускладненого резистентністю до інсуліну. Стрілочками позначено підвищення рівня експресії генів, а T-подібними лініями – зниження рівня експресії генів

#### **4.2. Вплив ожиріння на експресію генів, які кодують ключові фактори сигнальних шляхів**

Ожиріння, а також метаболічний синдром є результатом тісних взаємодій між генами та факторами навколишнього середовища. Дослідження, проведені на молекулярному та клітинному рівнях продемонстрували, що між розвитком метаболічних порушень й дисрегуляцією добових ритмів існує тісний взаємозв'язок через порушення регуляції експресії циркадальних та багатьох інших генів, включаючи гени, що кодують протеїнкінази і протеїнофосфатази для фосфорилування та дефосфорилування різних регуляторних факторів. Протеїнофосфатази регулюють широкий спектр різних фізіологічних процесів, включаючи ріст і проліферацію клітин, біогенез, а також активність факторів, пов'язаних із резистентністю до інсуліну та ожирінням.

У людини, зв'язування VEGF-A з VEGFR2 і фосфорилування рецептора призводить до рекрутингу PLC, що у свою чергу через активацію PKC, фосфорилує MAPK/позаклітинну сигнальну-регульовану кіназу1/2 (ERK1), що призводить до проліферації ендотеліальних клітин та ангіогенезу, минаючи класичний Ras-Raf-MEK-MAPK шлях [176]. Відомо, що VEGF індукує DUSP1, що локалізована як у ядрі, так і в цитоплазмі, а DUSP1 дефосфорилує, в свою чергу, кіназу p38, яка фосфорилує VEGF, тим самим інгібуючи проліферацію. Таким чином, індукція MKP1 фосфатази за допомогою VEGF слугує авторегуляторним ланцюгом, який контролює активацію каскадів ERK1/2 та p38 ростовими факторами, тим самим регулюючи проліферацію й ангіогенез. У нашій роботі було виявлено знижений рівень експресії DUSP1 як за ожиріння, так і за ожиріння, ускладненим порушеною толерантністю до глюкози, що показано на рис. 3.18, і це, можливо, є наслідком



зниженого рівня ендотеліального фактора росту судин, що ще раз підтверджує дані про зміни в ангиогенезі у підшкірній жировій тканині за ожиріння.

Більше того, знижена експресія фосфатази DUSP4 (MKP2) у підшкірній жировій тканині чоловіків за ожиріння, можливо, сприяє росту жирової тканини, тому що підвищення DUSP4 призводить до інгібування ядерного ERK1/2 сигнального шляху, який відіграє важливу роль у регуляції клітинного росту і диференціації [177]. Таким чином, наші результати щодо зниження експресії протеїнової фосфатази DUSP4 у підшкірній жировій тканині людей з ожирінням мають свідчити про ядерну активацію ERK1/2. Цікаво зазначити, що фосфатаза DUSP6 може брати участь у проліферації адипоцитів за умов ожиріння через регуляцію апоптозу, опосередкованого TP53, і зміною рівнів експресії протеїнів родини BCL2, оскільки DUSP6 є транскрипційною мішенню супресора пухлинного росту TP53 [178].

Крім того, ми показали, що рівень експресії DUSP22 також знижується у підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням і, можливо, пригнічує міграцію клітин, оскільки ця фосфатаза активує сигнальний шлях JNK шляхом дефосфорилування протеїнкінази c-Jun N-кінцевої кінази, яка, у свою чергу, сприяє міграції клітин [179]. Також за стресу ендоплазматичного ретикулума, що розвивається за умов ожиріння, спостерігається гіперактивація JNK-протеїнкінази, яка фосфорилує IRS1 по серину, а це призводить до пригнічення сигналювання інсуліну. Зменшення рівня експресії DUSP22 може призводити до зниження активації JNK-протеїнкінази і сприяти порушенню чутливості до інсуліну.

Ми також показали, що за умов ожиріння, ускладненого порушеною толерантністю до глюкози, як правило, спостерігається не велике, але статистично значиме підвищення рівня експресії різних генів протеїнової фосфатази у підшкірній жировій тканині чоловіків. Цілком можливо, що ці зміни в експресії генів *DUSP* пов'язані з розвитком резистентності до інсуліну та метаболічних ускладнень, включаючи порушення толерантності до глюкози, але функціональне значення змін в експресії генів *DUSP* ще не повністю зрозуміло і потребує подальших досліджень.

Наші результати також демонструють знижений рівень *PTEN* у підшкірній жировій тканині за умов ожиріння як з нормальною толерантністю до глюкози, так і за ожиріння, ускладненого порушеною толерантністю до глюкози. Ці зміни в експресії гена *PTEN* можуть сприяти розвитку ожиріння, оскільки, на відміну від більшості ферментів тирозинфосфатаз, *PTEN* переважно дефосфорилує субстрати фосфоінозитиду і бере участь у регуляції клітинного циклу, запобігаючи зайвому поділу клітин, а також контролює інсулінову сигналізацію й гомеостаз глюкози [180]. З нашими результатами узгоджуються дані про те, що ефект мутації *PTEN* є, напевно, дивергентним: підвищений ризик ожиріння і онкології, але знижений ризик діабету 2 типу.

Отже, наші результати пояснюють певні молекулярні механізми росту жирової тканини за умов ожиріння і є важливими для розуміння розвитку ожиріння та пов'язаних з ожирінням метаболічних ускладнень, оскільки фосфатази *DUSP* тісно пов'язані з метаболічним гомеостазом, і зміни в експресії їх генів можуть модулювати внутрішньоклітинні сигнальні мережі та призводити до розвитку ожиріння та резистентності до інсуліну.

Таблиця 4.2. Вплив ожиріння на регуляцію експресії генів *DUSP1*, *DUSP4*, *DUSP6*, *DUSP22* та *PTEN*, які кодують ключові фактори сигнальних шляхів

Гени	Контроль	Ожиріння+НТГ	Ожиріння+ПТГ
<i>DUSP1</i>	100%	↓ 28%	↑ 17%
<i>DUSP4</i>	100%	↓ 63%	↑ 18%
<i>DUSP6</i>	100%	↓ 40%	↑ 20%
<i>DUSP22</i>	100%	↓ 27%	↑ 15%
<i>PTEN</i>	100%	↓ 30%	змін немає

Примітки: ↓ - рівень експресії знижується; ↑ - рівень експресії підвищується.

### **4.3. Експресія генів факторів росту, які контролюють процеси проліферації у підшкірній жировій тканині.**

Наші дослідження показали, що ожиріння асоціюється з підвищеним рівнем експресії генів, які кодують регуляторні фактори, що беруть участь у розвитку ожиріння та його ускладнень. Ми вивчали експресію генів, які головним чином, пов'язані з підвищеною регуляцією проліферативних процесів у підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням і резистентністю до глюкози. Дані результати показують, що ожиріння веде до значного підвищення рівня експресії таких генів, як *CTGF*, *MYLK*, *MEST*, *TPD52*, *ITGAM*, *ITGB1*, *FAT*, *PPDPF*, *SFRP4*, *CTHRC1* та *EGFL1* у підшкірній жировій тканині. Результати цих досліджень узгоджуються з даними інших дослідників про участь цих генів у регуляції різних проліферативних процесів і ангиогенезі [181].

Адіпогенез знаходиться під контролем різних транскрипційних факторів. Процес диференціювання регулюється, в основному, такими транскрипційними факторами, як C/EBP та PPAR. Підвищена активність C/EBP і PPAR індукують експресію генів, які контролюють процеси накопичення ліпідів, чутливість до інсуліну й термінальну диференціацію адипоцитів. Диференціація адипоцитів також залежить від реорганізації позаклітинного матриксу, процесу, опосередкованого системою матричної металопротеїнази (MMP), яка, у свою чергу, знаходиться під контролем інгібітору тканинної металопротеїнази-1 (TIMP-1). CCN2 регулює експресію TIMP-1, а також індукує експресію SERPINE1 [124]. Наші результати виявили підвищений рівень CTGF як за умов ожиріння, так і за умов ожиріння, ускладненим порушеною толерантністю до глюкози, і можуть вказувати на участь даного фактора росту в активації інгібітору активатора плазміногену та розростанні жирової тканини. Також CTGF є важливим регулятором ангиогенезу, зв'язування CTGF з проангіогенним фактором VEGF-A знижує інтенсивність ангиогенезу [182]. Kuiper et al [183] описали баланс VEGF і CTGF як головну роль у ангиофібротичному перемикачі, завдяки чому знижена активність VEGF пов'язана зі

зростанням активності CTGF, що призводить до трансформації мембрани, до більш фіброзного фенотипу [184].

Підвищення рівня експресії мРНК MYLK у клітині може сприяти проліферації, міграції, ангиогенезу, а також росту пухлин і метастазів як *in vitro* так і *in vivo* за рахунок RAS/ERK сигнального шляху [141]. Ми показали, що експресія мРНК MYLK збільшується у групі чоловіків з ожирінням, і ці результати співпадають з ростом жирової тканини і збільшеним індексом маси тіла. Однак, розвиток толерантності до глюкози у чоловіків з ожирінням не супроводжується додатковим підвищенням рівня мРНК MYLK. Отже, MYLK бере участь у розвитку ожиріння, але не у розвитку резистентності до інсуліну.

Мезодермальний специфічний транскрипт MEST – член родини  $\alpha/\beta$  гідроксилаз і підвищена його експресія пов'язана з ожирінням, збільшеними адипоцитами і проліферацією преадипоцитів. Мезодермальний специфічний транскрипт експресується у мезенхімальній тканині, яка є джерелом жирової тканини. Нокаут шурів за геном *MEST* призводив до зниження маси тіла та покращення функціонального стану за умов ожиріння [185]. Крім того, MEST локалізований також в ендоплазматичному ретикулумі та апараті Гольджі, що додатково вказує на його функцію у зберіганні жиру в адипоцитах [186]. Наші результати узгоджуються з літературними даними [186] і демонструють підвищений рівень експресії гена *MEST* за ожиріння, оскільки цей регуляторний фактор може брати участь у рості жирової тканини. Але резистентність до інсуліну істотно не впливає на рівень експресії мРНК MEST.

Численні дослідження демонструють роль TPD52 (PrLZ) в регуляції ліпідного метаболізму, зокрема його здатність підвищувати зберігання ліпідів і сприяти утворенню ліпідних крапель у межах ER [158]. Наші результати виявили збільшений рівень експресії мРНК TPD52 за умов ожиріння у підшкірній жировій тканині, а розвиток резистентності до інсуліну додатково його підвищує. Ліпіди відіграють різноманітну роль у побудові клітинних структур, утворюючи мембранні мікродомени для функціонування каркасу білкових комплексів, які слугують у якості сховищ для жирів і діють як сигнальні молекули. Всі ці процеси мають важливе

значення за онкології і змінений ліпідний обмін є ознакою онкологічних процесів та характеризуються підвищеним рівнем TPD52 [158]. Отже, TPD52 може брати участь у рості жирової тканини.

Ожиріння може характеризуватися про-запальним станом, що супроводжується збільшеним накопиченням макрофагів у жировій тканині, які можуть сприяти подальшим метаболічним порушенням, таким як резистентність до інсуліну. Інтегрин  $\alpha$ M, або CD11b експресуються на моноцитах, макрофагах і є критичними для їх функціонування. Інтергін, альфа М (CD11b) пригнічує проліферацію макрофагів жирової тканини і цей процес опосередкований IL-4 / STAT6 шляхом [187, 188]. Тобто можлива роль CD11b у пригніченні запалення, пов'язаного з ожирінням. Проведеними нами дослідженнями встановлено, що рівень експресії мРНК інтегрину, альфа М підвищується за умов ожиріння, але резистентність до інсуліну не впливає на його рівень, що може вказувати на роль цього інтегрину у пригніченні проліферації.

Інтегрин  $\beta$ 1, як і інші інтегрини, відіграють важливу роль у взаємодії клітини з позаклітинним матриксом, що є важливим сигналом для регуляції клітинної проліферації та виживання. CD29 бере участь у рості злоякісних пухлин і апоптозі [189]. Отримані нами результати показали підвищений рівень експресії гена інтегрину  $1\beta$  за умов ожиріння, що може вказувати на його можливу роль у проліферації адипоцитів.

Виявлене нами збільшення експресії генів *FAT1*, *PPDPF*, *CTHRC1* та *EGFL6* у підшкірній жировій тканині за умов ожиріння безсумнівно має відношення до змін процесів проліферації, міграції клітин та акумуляції ліпідів. Результати дослідження цих та низки інших генів підсумовані в таблиці 4.3.

Посилення експресії гена *SFRP4* у підшкірній жировій тканині за умов ожиріння і ще більше підвищення рівня його експресії при порушенні толерантності до глюкози узгоджується з літературними даними [190] про важливу участь протеїну *SFRP4* у розвитку резистентності до інсуліну та порушенні толерантності до глюкози. Разом з тим, з порушенням толерантності до глюкози на фоні ожиріння корелюють зміни у експресії лише двох генів: *CTHRC1* та *EGFL6*, хоча детальні

механізми як розвитку ожиріння, так і його ускладнень, заслуговують на подальше всебічне вивчення.

Таблиця 4.3. Вплив ожиріння на регуляцію експресії генів *CTGF*, *MYLK*, *MEST*, *ITAG*, *ITGB1*, *FAT*, *PPDPF*, *SFRP4*, *CTHRC1*, *EGFL6*, які кодують фактори росту проліферації у підшкірній жировій тканині

Гени	Контроль	Ожиріння+НТГ	Ожиріння+ПТГ
CTGF	100%	↑ 434%	↑ 269%
MYLK	100%	↑ 58%	↑ 21%
MEST	100%	↑ 41%	змін немає
ITAG	100%	↑ 51%	змін немає
ITGB1	100%	↑ 48%	змін немає
FAT	100%	↑ 72%	змін немає
PPDPF	100%	↑ 51%	змін немає
SFRP4	100%	↑ у 4 рази	↑ 24%
CTHRC1	100%	↑ 151%	↑ 32%
EGFL6	100%	↑ у 11,5 разів	↑ 63%

Примітки: ↑ - рівень експресії підвищується

Активація імунних рецепторів, таких як Toll-подібні рецептори (TLR), за ожиріння та метаболічного синдрому, можливо, є частиною про-запального процесу, що викликаний патологічним ростом жирової тканини і веде до дисфункції ендотеліалію [191, 192]. Накопичення насичених жирних кислот за ожиріння призводить до стресу ER у відповідь на неправильно згорнуті протеїни (UPR), який активує Toll-подібні рецептори. Вони у свою чергу стимулюють про-запальні реакції, включаючи синтез цитокінів (TNF) та гіперактивіацію JNK і IKK кіназ, що порушують сигналювання інсуліну [193]. Сплайс-варіант XBP-1 може відігравати роль у синтезі TNF, що, у свою чергу, сприяє ендотеліальній дисфункції і розвитку резистентності до інсуліну. Наявність стресу ендоплазматичного ретикулума за ожиріння ми спостерігаємо за підвищенням експресії гена *HSPA5*, оскільки *HSPA5* є

стрес-залежним шапероном ВІР. Цей шаперон причетний до формування третинної структури протеїнів в ЕР і рівень його експресії підвищується за умов індукції стресу ендоплазматичного ретикулула. Підвищений рівень експресії TNF за ожиріння може мати важливе значення у порушенні ендотеліальних судиннорозширювальних властивостей. Отримані нами результати також показали знижений рівень експресії мРНК ADD3 як за умов ожиріння без резистентності до інсуліну, так і за умов ожиріння, ускладненого порушеною толерантністю до глюкози у підшкірній жировій тканині, що свідчить про незалежність експресії цього гена від ефективності дії інсуліну.

ADM – пептидний гормон, який регулює секрецію різних гормонів, включаючи лептин та адипонектин, сприяє ангиогенезу й бере участь у розвитку метаболічного синдрому [194]. Біологічні аспекти ADM переважно опосередковуються його взаємодією з двома рецепторами клітинної поверхні: кальцитонін-подібного рецептора (CRLR) і протеїнів, які модифікують рецепторну активність (RAMPs) [195]. Zhang et al [196] показали, що ADM2 надекспресується жировою тканиною за умов ожиріння, і цим поліпшує стан дисліпідемії. Також Adrenomedullin 2 є одним з генів-мішеней HIF-1 [197]. Крім того, ADM є про-ангіогенним фактором і тим самим відіграє критичну роль у проліферації злоякісних пухлин, а також може стимулювати проліферацію людських стовбурових клітин пуповинної крові за допомогою аутокринного механізму [195]. Ми продемонстрували, що у чоловіків з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози підвищується рівень експресії ADM, а це свідчить про його участь у розвитку ожиріння та метаболічних ускладнень.

На рис. 4.2 схематично зображено вплив ожиріння та резистентності до інсуліну на фоні ожиріння на рівень експресії генів, які кодують ключові фактори регуляції різних метаболічних процесів, у підшкірній жировій тканині дорослих чоловіків.

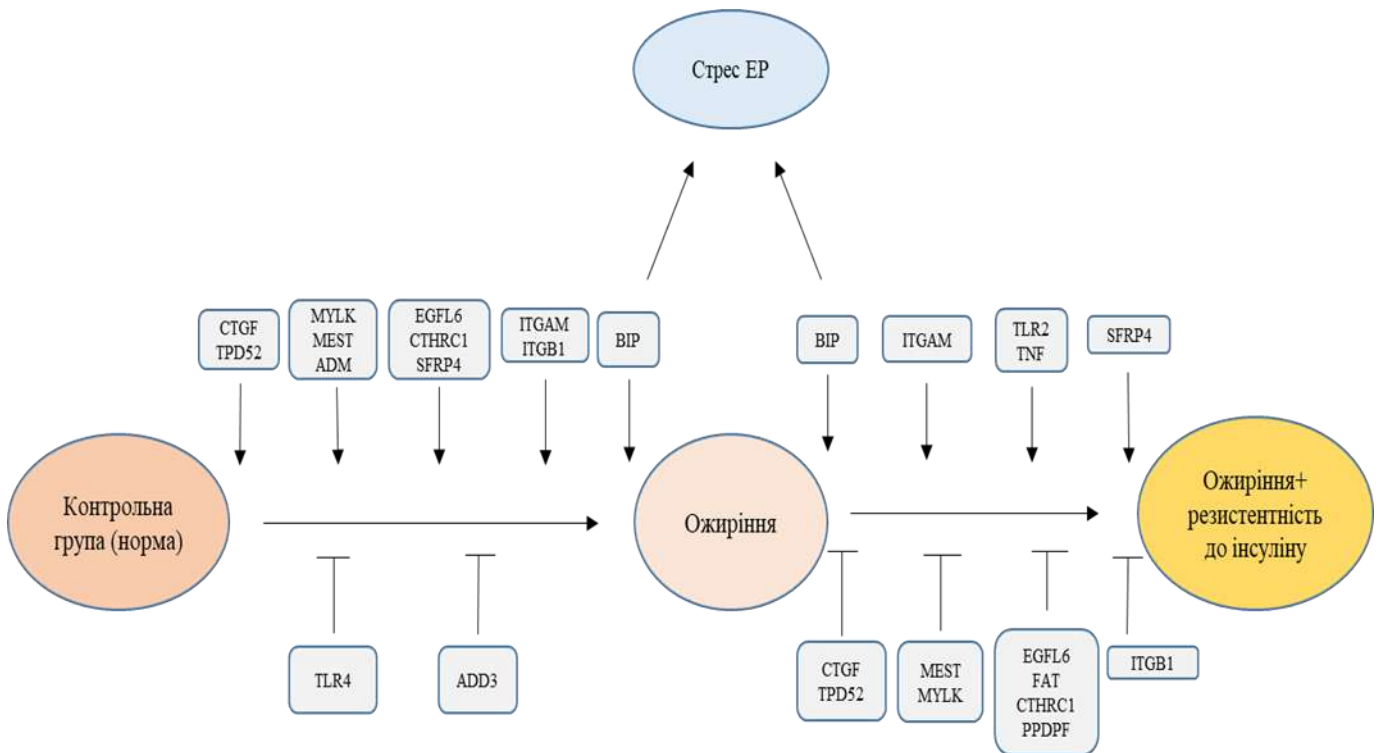


Рис. 4.2. Вплив ожиріння та резистентності до інсуліну на фоні ожиріння на рівень експресії генів, які кодують ключові фактори регуляції різних метаболічних процесів, у підшкірній жировій тканині дорослих чоловіків. Вертикальними стрілочками позначено вплив підвищеного рівня експресії генів на розвиток як ожиріння, так і резистентності до інсуліну, а Т-подібними лініями –вплив зниженого рівня експресії генів на ці процеси.

Отримані нами результати вносять певний вклад у розуміння молекулярних механізмів підвищеної схильності до карцерогенезу організмів з ожирінням, оскільки ADM і HSPA5 задіяні не лише у розвитку ожиріння, але й контролюють ріст злоякісних пухлин. Усе це узгоджується з дослідженнями, проведеними японськими вченими на щурах, нокаутних за геном *SNARK*, які показали, що розвиток ожиріння та метаболічного синдрому у таких тварин асоціюється зі схильністю до утворення злоякісних пухлин [198].

МікроРНК (miRNA) – клас ендогенних малих некодуючих одноланцюгових молекул РНК, які відіграють важливу регуляторну роль в транскрипції й трансляції. МікроРНК зв'язуються з 3'-нетранслюючою ділянкою (3'-UTR), що призводить до



прямої деградації мРНК або трансляційного блокування гена-мішені. Функціонування мікроРНК характеризується плейотропністю, так рівень експресії однієї мРНК може регулюватися багатьма мікроРНК [199]. Як видно із даних, приведених на рис. 3.36, miR-143 комплементарно зв'язується з 3'-UTR мРНК PLAУ, PLAUR та TLR2. Знижений рівень експресії miR-143 (3.39) може бути результатом підвищеної регуляції PLAУ і його рецептора, а також TLR2. Так, miR-143 відіграє важливу роль гена-супресора пухлин, може інгібувати експресію TLR2 та NF-κB і цим призводити до пригнічення проліферації, і за рахунок цього знижувати інвазію пухлин та міграцію [200].

МікроРНК можуть брати участь в індукції про-ангіогенних ефектів та ліполізу [24, 201]. MiR-21 модулює ангіогенез, шляхом зв'язування з PLAУ [202]. Важливо відмітити, що мішенню miR-21 являється мРНК ITGAM (рис. 3.36), останній є рецептором для фібриногену, який бере участь у згортанні крові. Крім того, Ghalali, Högberg [203] показали, що miR-190 може регулювати рівень експресії мРНК PTEN. Отримані нами результати підтверджують дослідження вище згаданих науковців і показують, що підвищений рівень експресії miR-19a (рис. 3.37) може призводити до зниженого рівня мРНК PTEN, унаслідок чого підвищується активність АКТ та активувати ріст злоякісних пухлин за рахунок посилення сигналів до поділу клітин. Крім того, знижений рівень PTEN сприяє поліпшенню поглинання глюкози жировою тканиною. Отже, miR-19a може брати участь у покращенні системної толерантності до глюкози за ожиріння.

Мішенню для miR-145 є ділянка мРНК регулятора фібринолітичної системи SERPINE1 (рис. 3.37). Ми показали, що рівень мікроРНК-145 зменшувався порівняно з контролем, що може бути одним із факторів підвищеного рівня експресії гена *SERPINE1* у підшкірній жировій тканині за умов ожиріння.

Отже, мікроРНК беруть участь у різних фізіологічних та патологічних процесах шляхом пост-транскрипційної регуляції експресії генів, однак, молекулярні механізми з'ясовані ще недостатньо і потребують подальшого більш детального вивчення.

## Висновки

У дисертаційній роботі представлено теоретичне узагальнення і експериментально підтвержене рішення актуальної наукової задачі щодо ролі генів, які контролюють процеси проліферації та ангиогенезу у підшкірній жировій тканині за умов ожиріння з нормальною та порушеною толерантністю до глюкози. Отримані результати вказують на репрограмування геному за умов ожиріння і його метаболічних ускладнень, зокрема резистентності до інсуліну, та надають інформацію про важливу роль ключових регуляторних генів у розвитку цих патологій.

1. Встановлено, що у підшкірній жировій тканині дорослих чоловіків з ожирінням знижується рівень експресії генів *VEGF-A*, *VEGF-A-189*, *PDGFC*, *FGF2* та *FGFRL1* порівняно з контрольною групою і що вказує на пригнічення ангиогенезу.

2. Показано, що у підшкірній жировій тканині пацієнтів з ожирінням знижується рівень експресії генів *DUSP1*, *DUSP4*, *DUSP6*, *DUSP22*, *ADD3* та *PTEN* порівняно з контрольною групою, а розвиток резистентності до інсуліну підвищує рівень експресії генів усіх протеїнфосфатаз родини *DUSP*, але знижує *PTEN* при порівнянні з особами, які мали ожиріння і нормальну толерантність до глюкози

3. Показано, що рівень експресії генів *PLAT*, *PLAU*, *PLAUR*, *SERPINE1*, *HIF1A*, *E2F8*, *FGF1* і *FGFR2* у підшкірній жировій тканині чоловіків підвищується за умов ожиріння, причому розвиток резистентності до інсуліну призводить до подальшого збільшення рівня експресії генів *PLAU*, *PLAUR*, *SERPINE1* та *E2F8* і зниження – *PLAT*, *FGF1* та *FGFR2*, і що свідчить про порушення процесів проліферації та наявність прозапальних процесів.

4. Встановлено, що ожиріння супроводжується підвищеним рівнем експресії генів *CTGF*, *MYLK*, *MEST*, *TPD52*, *ITGB1* та *ITGAM* у жировій тканині чоловіків порівняно з контрольною групою, а порушення толерантності до глюкози за умов

ожиріння знижує рівень експресії цих генів у порівнянні з пацієнтами, які мали ожиріння і нормальну толерантність до глюкози, за винятком гена *ITGAM*.

5. Показано, що у підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози підвищується рівень експресії генів *FAT1*, *PPDPF*, *SFRP4*, *EGFL6*, *CTHRC1*, *ADM*, *TLR2* та *TNF* порівняно з контролем, а порушення толерантності до глюкози впливає лише на рівень експресії *CTHRC1*, *ADM*, *SFRP4*, *TNF* і *EGFL6*: знижує *EGFL6*, *CTHRC1* та *ADM* і підвищує *SFRP4* і *TNF*.

6. Виявлено зниження рівня експресії мікроРНК-7b, -21, -143, -145 та -190, які задіяні в пост-транскрипційній регуляції експресії генів *CTHRC1*, *ITGAM*, *TLR2*, *PLAU*, *PLAUR*, *SERPINE1* і *EGFL6*. Отримані результати вказують на важливу роль змін в експресії ключових регуляторних генів у розвитку ожиріння і його метаболічних ускладнень шляхом репрограмування геному.

**СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ**

1. Konige M, Wang H, Sztalryd C. Role of adipose specific lipid droplet proteins in maintaining whole body energy homeostasis. *Biochimica et biophysica acta*. 2014; 1842(3):393–401.
2. Vachharajani V, Granger DN. Adipose tissue: a motor for the inflammation associated with obesity. *IUBMB life*. 2009;61(4):424–430.
3. Pang C, Gao Z, Yin J. Macrophage infiltration into adipose tissue may promote angiogenesis for adipose tissue remodeling in obesity. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*. 2008; 295(2):E313–E322.
4. Singh P, Peterson TE, Barber K. R. Leptin upregulates the expression of plasminogen activator inhibitor-1 in human vascular endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2010;392(1):47–52.
5. Jung UJ, Choi MS. Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014;15(4):6184–6223.
6. Lawan A, Shi H, Gatzke F, Bennett A. Diversity and specificity of the mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 functions. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*. 2013;70(2):223–237.
7. Ahmad MK, Abdollah NA, Shafie NH. Dual-specificity phosphatase 6 (dusp6): a review of its molecular characteristics and clinical relevance in cancer. *Cancer Biology & Medicine*. 2018;15(1):14–28.
8. Jiao H, Tang P, Zhang Y. MAP kinase phosphatase 2 regulates macrophage-adipocyte interaction. *PLoS ONE*. 2015;10(3):e0120755.
9. Watanabe Y, Nagai Y, Takatsu K. Activation and regulation of the pattern recognition receptors in obesity-induced adipose tissue inflammation and insulin resistance. *Nutrients*. 2013;5(9):3757–3778.
10. Kita M, Nakae J, Kawano Y. Zfp238 regulates the thermogenic program in cooperation with foxo1. *iScience*. 2019;12:87–101.

11. Yamaoka M, Maeda N, Nakamura S. A pilot investigation of visceral fat adiposity and gene expression profile in peripheral blood cells. *PLOS ONE*. 2012;7(10):e47377.
12. Antonopoulos AS, Tousoulis D. The molecular mechanisms of obesity paradox. *Cardiovascular Research*. 2017;113(9):1074–1086.
13. Reddon H, Guéant J, Meyre D. The importance of gene–environment interactions in human obesity. *Clinical Neuroscience Research*. 2016;130(18):1571–1597.
14. Desai M, Beall M, Ross M. Developmental origins of obesity: programmed adipogenesis. *Current diabetes reports*. 2013;13(1):27–33.
15. Cakir I, Nillni EA. Endoplasmic reticulum stress, the hypothalamus, and energy balance. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2019;30(3):163–176.
16. Chang YC, Hee SW, Hsieh ML, The role of organelle stresses in diabetes mellitus and obesity: implication for treatment. *Analytical Cellular Pathology (Amsterdam)*. 2015;2015:972891.
17. Мінченко ДО, Кубайчук КІ, Губеня ОВ. Стрес ендоплазматичного ретикулу та ангиогенез. *Фізіологічний журнал*. 2013;59(4):93–106.
18. Barrera K, Stanek A, Okochi K. Acinar cell injury induced by inadequate unfolded protein response in acute pancreatitis. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology*. 2018;9(2):37–46.
19. Saraswat S, Mullins A, Hetman M, Whittemore S. Activating transcription factor-6 $\alpha$  deletion modulates the endoplasmic reticulum stress response after spinal cord injury but does not affect locomotor recovery. *Journal of Neurotrauma*. 2018;35(3):486–491.
20. Costantino S, Mohammed A, Ambrosini S, Paneni F. Epigenetic processing in cardiometabolic disease. *Atherosclerosis*. 2018;281:150-158.
21. Sáez T, Toledo F, Sobrevia L. Impaired signalling pathways mediated by extracellular vesicles in diabetes. *Molecular Aspects of Medicine*. 2019;18:1-8.
22. Montastier E, Beuzelin D, Martins F. Niacin induces mir-502-3p expression which impairs insulin sensitivity in human adipocytes. *International Journal of Obesity (2005)*. 2018. Nov 27. doi: 10.1038/s41366-018-0260-5. [Epub ahead of print].

23. Zhang Y. Crosstalk between micromas and peroxisome proliferator-activated receptors and their emerging regulatory roles in cardiovascular pathophysiology. *PPR Research*. 2018;2018:8530371.
24. Lorente-Cebrián S, González-Muniesa P, Milagro F, Martínez J. MicroRNAs and other non-coding rnas in adipose tissue and obesity: emerging roles as biomarkers and therapeutic targets. *Clinical Science (London, England: 1979)*. 2019;133(1):23–40.
25. Stafeev I, Podkuychenko N, Michurina S. Low proliferative potential of adipose-derived stromal cells associates with hypertrophy and inflammation in subcutaneous and omental adipose tissue of patients with type 2 diabetes mellitus. *Journal of Diabetes and Its Complications*. 2019;33(2):148–159.
26. Huang S, Xu Y, Peng W. Asymmetric dimethylarginine targets mapk pathway to regulate insulin resistance in liver by activating inflammation factors. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2018. Dec 2. doi: 10.1002/jcb.28021. [Epub ahead of print]
27. Ngo DT, Sverdlov AL, Karki S. Oxidative modifications of mitochondrial complex ii are associated with insulin resistance of visceral fat in obesity. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*. 2019;316(2):E168–E177.
28. Thompson JA, Webb RC. The potential role of toll-like receptors in programming of vascular dysfunction. *Clinical science (London, England: 1979)*. 2013;125(1):19–25.
29. Engin AB, Engin A, Gonul I, The effect of adipocyte-macrophage cross-talk in obesity-related breast cancer. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2019. Jan 1. pii: JME-18-0252.R1. doi: 10.1530/JME-18-0252. [Epub ahead of print]
30. Ghaben AL, Scherer PE, Adipogenesis and metabolic health. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. 2019;20(4):242-258.
31. Szczesna M, Kirszt K, Misztal T, Zieba DA. Downregulation of lrb in vmh/dmh during the second half of gestation and upregulation of socs-3 in arc in late-pregnant ewes - implications for leptin resistance. *General and Comparative Endocrinology*. 2019;274:73-79.

32. Cohen-Sharir Y, Kuperman Y, Apelblat D. Protein tyrosine phosphatase alpha inhibits hypothalamic leptin receptor signaling and regulates body weight in vivo. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2019;33(4):5101-5111.
33. Liu J, Yang X, Yu S, Zheng R. The leptin resistance. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2018;1090:145–163.
34. Francisco V, Ruiz-Fernández C, Pino J. Adipokines: linking metabolic syndrome, the immune system, and arthritic diseases. *Biochemical Pharmacology*. 2019. Mar 22. pii: S0006-2952(19)30116-9. doi: 10.1016/j.bcp.2019.03.030. [Epub ahead of print]
35. Pothuraju R, Rachagani S, Junker W. Pancreatic cancer associated with obesity and diabetes: an alternative approach for its targeting. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2018;37(1):319.
36. McDonald ME, Bender DP. Endometrial cancer: obesity, genetics, and targeted agents. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*. 2019;46(1):89–105.
37. Fujita K, Hayashi T, Matsushita M. Obesity, inflammation, and prostate cancer. *Journal of Clinical Medicine*. 2019;8(2):E201.
38. Andò S, Gelsomino L, Panza S. Obesity, leptin and breast cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Cancers*. 2019;11(1):62.
39. Dollet L, Zierath JR. Interplay between diet, exercise and the molecular circadian clock in orchestrating metabolic adaptations of adipose tissue. *The Journal of Physiology*. 2019;597(6):1439 - 1450.
40. Patan S. Vasculogenesis and angiogenesis. *Cancer Treatment and Research*. 2004;117:3–32.
41. Ledoux S, Queguiner I, Msika S. Angiogenesis associated with visceral and subcutaneous adipose tissue in severe human obesity. *Diabetes*. 2008;57(12):3247–3257.
42. Gerber HP, Malik AK, Solar GP. VEGF regulates haematopoietic stem cell survival by an internal autocrine loop mechanism. *Nature*. 2002;417(6892):954–958.
43. Corvera S, Gealekman O. Adipose tissue angiogenesis: impact on obesity and type-2 diabetes. *Biochimica Et Biophysica Acta*. 2014;1842(3):463–472.

44. Uccelli A, Wolff T, Valente P. Vascular endothelial growth factor biology for regenerative angiogenesis. *Swiss Medical Weekly*. 2019;149:w20011.
45. Wu LE, Meoli CC, Mangiafico SP. Systemic vegf-a neutralization ameliorates diet-induced metabolic dysfunction. *Diabetes*. 2014;63(8):2656–2667.
46. Zhu G, Lin Y, Liu H. Dll4-notch1 signaling but not vegf-a is essential for hyperoxia induced vessel regression in retina. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2018;507(1–4):400–406.
47. Saltarella I, Frassanito A, Lamanuzzi A. Homotypic and heterotypic activation of the notch pathway in multiple myeloma-enhanced angiogenesis: a novel therapeutic target?. *Neoplasia (New York, N.Y.)*. 2019;21(1):93–105.
48. Waltenberger J. VEGF resistance as a molecular basis to explain the angiogenesis paradox in diabetes mellitus. *Biochemical Society Transactions*. 2009;37(Pt 6):1167–1170.
49. Escudero CA, Herlitz K, Troncoso F. Pro-angiogenic role of insulin: from physiology to pathology. *Frontiers in Physiology*. 2017;8:204.
50. Song M, Finley SD. Mechanistic insight into activation of mapk signaling by pro-angiogenic factors. *BMC systems biology*. 2018;12(1):145.
51. Melincovici CS, Boşca AB, Şuşman S. Vascular endothelial growth factor (vegf) - key factor in normal and pathological angiogenesis. *Romanian Journal of Morphology and Embryology = Revue Roumaine De Morphologie Et Embryologie*. 2018;59(2):455–467.
52. Gaspar JM, Velloso LA. Hypoxia inducible factor as a central regulator of metabolism - implications for the development of obesity. *Frontiers in Neuroscience*. 2018;12:813.
53. Vendrell J, Maymó-Masip E, Tinahones F. Tumor necrosis-like weak inducer of apoptosis as a proinflammatory cytokine in human adipocyte cells: up-regulation in severe obesity is mediated by inflammation but not hypoxia. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2010;95(6):2983–2992.
54. Zhao X, Liu L, Li R. Hypoxia-inducible factor 1- $\alpha$  (hif-1 $\alpha$ ) induces apoptosis of human uterosacral ligament fibroblasts through the death receptor and



- mitochondrial pathways. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*. 2018;24:8722–8733.
55. Zhang C, Shen M, Teng F. Ultrasound-enhanced protective effect of tetramethylpyrazine via the ros/hif-1a signaling pathway in an in vitro cerebral ischemia/reperfusion injury model. *Ultrasound in Medicine & Biology*. 2018;44(8):1786–1798.
56. Reyes-Gibby CC, Wang J, Silvas MRT. MAPK1/erk2 as novel target genes for pain in head and neck cancer patients. *BMC genetics*. 2016;17:40.
57. Stivala S, Codilupi T, Brkic S. Targeting compensatory mek/erk activation increases jak inhibitor efficacy in myeloproliferative neoplasms. *The Journal of Clinical Investigation*. 2019;129(4):1596-1611.
58. Li H, Mao Y, Bouaziz M. Lens differentiation is controlled by the balance between pdgf and fgf signaling. *PLoS biology*. 2019;17(2):e3000133.
59. Wu X, Liu W, Ding H. A pdgf-c creert2 knock-in mouse model for tracing pdgf-c cell lineages during development. *Genesis (New York, N.Y.: 2000)*. 2018;56(2):e23092.
60. Folestad E, Kunath A, Wågsäter D. PDGF-c and pdgf-d signaling in vascular diseases and animal models. *Molecular Aspects of Medicine*. 2018;62:1–11.
61. Ruffini F, Levati L, Graziani G. Platelet-derived growth factor-c promotes human melanoma aggressiveness through activation of neuropilin-1. *Oncotarget*. 2017;8(40):66833–66848.
62. Li H, Zeitelhofer M, Nilsson I. Development of monoclonal anti-pdgf-cc antibodies as tools for investigating human tissue expression and for blocking pdgf-cc induced pdgfr $\alpha$  signalling in vivo. *PloS One*. 2018;13(7):e0201089.
63. Liu T, Ma W, Xu H. PDGF-mediated mesenchymal transformation renders endothelial resistance to anti-vegf treatment in glioblastoma. *Nature Communications*. 2018;9(1):3439.
64. Zeitelhofer M, Li H, Adzemovic MZ. Preclinical toxicological assessment of a novel monoclonal antibody targeting human platelet-derived growth factor cc (pdgf-cc) in pdgf-cchum mice. *PloS One*. 2018;13(7):e0200649.

65. Chudzian J, Szlachcic A, Zakrzewska M. Specific antibody fragment ligand traps blocking fgf1 activity. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;19(9):2470.
66. Kostas M, Lampart A, Bober J. Translocation of exogenous fgf1 and fgf2 protects the cell against apoptosis independently of receptor activation. *Journal of Molecular Biology*. 2018;430(21):4087–4101.
67. Yang Q, Li X. Molecular network basis of invasive pituitary adenoma: a review. *Frontiers in Endocrinology*. 2019;10:7.
68. Schliermann A, Nickel J. Unraveling the connection between fibroblast growth factor and bone morphogenetic protein signaling. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;19(10):E3220.
69. Widberg CH, Newell FS, Bachmann AW. Fibroblast growth factor receptor 1 is a key regulator of early adipogenic events in human preadipocytes. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2009;296(1):E121–E131.
70. He J, Chen DL, Samocha-Bonet D. Fibroblast growth factor-1 (fgf-1) promotes adipogenesis by downregulation of carboxypeptidase a4 (cpa4) - a negative regulator of adipogenesis implicated in the modulation of local and systemic insulin sensitivity. *Growth Factors (Chur, Switzerland)*. 2016;34(5–6):210–216.
71. Manousakidi S, Guillaume A, Pirou C. FGF1 induces resistance to chemotherapy in ovarian granulosa tumor cells through regulation of p53 mitochondrial localization. *Oncogenesis*. 2018;7(2):18.
72. Cedano Prieto D, Cheng Y, Chang C. Direct integrin binding to insulin-like growth factor-2 through the c-domain is required for insulin-like growth factor receptor type 1 (igf1r) signaling. *PloS One*. 2017;12(9):e0184285.
73. Wang A, Yan X, Zhang C. Characterization of fibroblast growth factor 1 in obese children and adolescents. *Endocrine Connections*. 2018;7(8):932–940.
74. Presta M, Foglio E, A. Churruca Schuind, R. Ronca Long pentraxin-3 modulates the angiogenic activity of fibroblast growth factor-2 / M. Presta, // *Frontiers in Immunology*. — 2018. — Vol. 9. — P. 2327.

75. Mao Y, Liu X, Song Y. VEGF-a/vegfr-2 and fgf-2/fgfr-1 but not pdgf-bb/pdgfr- $\beta$  play important roles in promoting immature and inflammatory intraplaque angiogenesis. *PLoS One*. 2018;13(8):e0201395.
76. Guo F, Zhang H, Jia Z. Chemoresistance and targeting of growth factors/cytokines signalling pathways: towards the development of effective therapeutic strategy for endometrial cancer. *American Journal of Cancer Research*. 2018;8(7):1317–1331.
77. Chang H, Song J, Wu J, Y. Zhang E2F transcription factor 8 promotes cell proliferation via ccnd1/p21 in esophageal squamous cell carcinoma. *OncoTargets and Therapy*. 2018;11:8165–8173.
78. Weijts BG, Westendorp B, Hien BT. Atypical e2fs inhibit tumor angiogenesis. *Oncogene*. 2018;37(2):271–276.
79. Wang L, Chen L, Liu Z. PAI-1 exacerbates white adipose tissue dysfunction and metabolic dysregulation in high fat diet-induced obesity. *Frontiers in Pharmacology*. 2018;9:1087.
80. Fortenberry YM. Plasminogen activator inhibitor-1 inhibitors: a patent review (2006-present). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. 2013;23(7):801–815.
81. Jankun J, Al-Senaidy A, Skrzypczak-Jankun E. Can inactivators of plasminogen activator inhibitor alleviate the burden of obesity and diabetes? (review). *International Journal of Molecular Medicine*. 2012;29(1):3–11.
82. Lijnen HR, Maquoi E, Demeulemeester D. Modulation of fibrinolytic and gelatinolytic activity during adipose tissue development in a mouse model of nutritionally induced obesity. *Thrombosis and Haemostasis*. 2002;88(2):345–353.
83. Seki T, Miyasu T, Noguchi T. Reciprocal regulation of tissue-type and urokinase-type plasminogen activators in the differentiation of murine preadipocyte line 3t3-l1 and the hormonal regulation of fibrinolytic factors in the mature adipocytes. *Journal of Cellular Physiology*. 2001;189(1):72–78.
84. Kenny S, Gamble J, Lyons S. Gastric expression of plasminogen activator inhibitor (pai)-1 is associated with hyperphagia and obesity in mice. *Endocrinology*. 2013;154(2):718–726.

85. Li S, Wei X, He J. Plasminogen activator inhibitor-1 in cancer research. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*. 2018;105:83–94.
86. Bifulco K, Longanesi-Cattani I, Liguori E. A urokinase receptor-derived peptide inhibiting vegf-dependent directional migration and vascular sprouting. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2013;12(10):1981–1993.
87. Larusch GA, Merkulova A, Mahdi F. Domain 2 of upar regulates single-chain urokinase-mediated angiogenesis through  $\beta$ 1-integrin and vegfr2. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*. 2013;305(3):H305-320.
88. Breuss JM, Uhrin P. VEGF-initiated angiogenesis and the upa/upar system. *Cell Adhesion & Migration*. 2012;6(6):535–615.
89. Madunić J. The urokinase plasminogen activator system in human cancers: an overview of its prognostic and predictive role. *Thrombosis and Haemostasis*. 2018;118(12):2020–2036.
90. Canello R, Rouault C, Guilhem G. Urokinase plasminogen activator receptor in adipose tissue macrophages of morbidly obese subjects. *Obesity Facts*. 2011;4(1):17–25.
91. Parveen A, Subedi L, Kim HW. Phytochemicals targeting vegf and vegf-related multifactors as anticancer therapy. *Journal of Clinical Medicine*. 2019;8(3):350.
92. Gupta V, Kumar S, Pratap A. Association of itgam, tnfsf4, tnfaip3 and stat4 gene polymorphisms with risk of systemic lupus erythematosus in a north indian population. *Lupus*. 2018;27(12):1973–1979.
93. Kovac J, Husse J, Oster H. A time to fast, a time to feast: the crosstalk between metabolism and the circadian clock. *Molecules and Cells*. 2009;28(2):75–80.
94. Ruderman NB, Carling D, Prentki M, Cacicedo JM. AMPK, insulin resistance, and the metabolic syndrome. *The Journal of Clinical Investigation*. 2013;123(7):2764–2772.
95. Wang S, Kaufman RJ. The impact of the unfolded protein response on human disease. *The Journal of Cell Biology*. 2012;197(7):857–867.

96. Gumpena R, Lountos GT, Raran-Kurussi S. Crystal structure of the human dual specificity phosphatase 1 catalytic domain. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*. 2018;27(2):561–567.
97. Liu R, Molkenin JD. Regulation of cardiac hypertrophy and remodeling through the dual-specificity mapk phosphatases (dusps). *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2016;101:44–49.
98. Emanuelli B, Eberlé D, Suzuki R, Kahn CR. Overexpression of the dual-specificity phosphatase mkp-4/dusp-9 protects against stress-induced insulin resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(9):3545–3550.
99. Shah SA, Ishinaga H, Takeuchi K. Clarithromycin inhibits tnf- $\alpha$ -induced muc5ac mucin gene expression via the mkp-1-p38mapk-dependent pathway. *International Immunopharmacology*. 2017;49:60–66.
100. Dickinson RJ, Delavaine L, Cejudo-Marín R. Phosphorylation of the kinase interaction motif in mitogen-activated protein (map) kinase phosphatase-4 mediates cross-talk between protein kinase a and map kinase signaling pathways. *The Journal of Biological Chemistry*. 2011;286(44):38018–38026.
101. Pourteymour S, M. Hjorth, S. Lee Dual specificity phosphatase 5 and 6 are oppositely regulated in human skeletal muscle by acute exercise / S. Pourteymour, [et al.] // *Physiological Reports*. — 2017. — Vol. 5, No. 19. - P. e13459.
102. Zhao BM, Keasey SL, Tropea JE. Phosphotyrosine substrate sequence motifs for dual specificity phosphatases. *PLoS ONE*. 2015;10(8):e0134984.
103. Jeong DG, Wei CH, Ku B. The family-wide structure and function of human dual-specificity protein phosphatases. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*. 2014;70(Pt 2):421–435.
104. Huang CY, Tan TH. DUSPs, to map kinases and beyond. *Cell & Bioscience*. 2012;2(1):24.
105. Queipo MJ, Gil-Redondo JC, Morente V. P2X7 nucleotide and egf receptors exert dual modulation of the dual-specificity phosphatase 6 (mkp-3) in granule neurons

- and astrocytes, contributing to negative feedback on erk signaling. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2018;10:448.
106. Boulding T, Wu F, McCuaig R. Differential roles for dusp family members in epithelial-to-mesenchymal transition and cancer stem cell regulation in breast cancer. *PLoS ONE*. 2016;11(2):e0148065.
  107. Ríos P, Nunes-Xavier CE, Tabernero L. Dual-specificity phosphatases as molecular targets for inhibition in human disease. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2014;20(14):2251–2273.
  108. Singh GB, Khanna S, Raut SK. DUSP-1 gene expression is not regulated by promoter methylation in diabetes-associated cardiac hypertrophy. *Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease*. 2017;11(5–6):147–154.
  109. Kaltenmeier CT, Vollmer LL, Verneti LA. A tumor cell-selective inhibitor of mitogen-activated protein kinase phosphatases sensitizes breast cancer cells to lymphokine-activated killer cell activity. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2017;361(1):39–50.
  110. Singh GB, Raut SK, Khanna S. MicroRNA-200c modulates dusp-1 expression in diabetes-induced cardiac hypertrophy. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2017;424(1–2):1–11.
  111. Wang J, Zhou JY, Kho D. Role for dusp1 (dual-specificity protein phosphatase 1) in the regulation of autophagy. *Autophagy*. — 2016. — Vol. 12, No. 10. — P. 1791–1803.
  112. Mills BN, Albert GP, Halterman MW. Expression profiling of the map kinase phosphatase family reveals a role for dusp1 in the glioblastoma stem cell niche. *Cancer Microenvironment: Official Journal of the International Cancer Microenvironment Society*. 2017;10(1–3):57–68.
  113. Kučera J, Netušilová J, Sladeček S. Hypoxia downregulates mapk/erk but not stat3 signaling in ros-dependent and hif-1-independent manners in mouse embryonic stem cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2017;2017:4386947.

114. Skopelja-Gardner S, Saha M, Alvarado-Vazquez PA. Mitogen-activated protein kinase phosphatase-3 (mkp-3) in the surgical wound is necessary for the resolution of postoperative pain in mice. *Journal of Pain Research*. 2017;10:763–774.
115. Rastogi R, Jiang Z, Ahmad N. Rapamycin induces mitogen-activated protein (map) kinase phosphatase-1 (mkp-1) expression through activation of protein kinase b and mitogen-activated protein kinase kinase pathways. *The Journal of Biological Chemistry*. 2013;288(47):33966–33977.
116. Kim HS, Asmis R. Mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 (mkp-1) in macrophage biology and cardiovascular disease. a redox-regulated master controller of monocyte function and macrophage phenotype. *Free Radical Biology & Medicine*. 2017;109:75–83.
117. Huang CY, Lin YC, Hsiao WY. DUSP4 deficiency enhances cd25 expression and cd4+ t-cell proliferation without impeding t-cell development. *European Journal of Immunology*. 2012;42(2):476–488.
118. Finch AR, Caunt CJ, Perrett RM. Dual specificity phosphatases 10 and 16 are positive regulators of egf-stimulated erk activity: indirect regulation of erk signals by jnk/p38 selective mapk phosphatases. *Cellular Signalling*. 2012;24(5):1002–1011.
119. Wang MC, Bohmann D, Jasper H. JNK signaling confers tolerance to oxidative stress and extends lifespan in drosophila. *Developmental Cell*. 2003;5(5):811–816.
120. Lawan A, Al-Harthi S, Cadalbert L. Deletion of the dual specific phosphatase-4 (dusp-4) gene reveals an essential non-redundant role for map kinase phosphatase-2 (mkp-2) in proliferation and cell survival. *The Journal of Biological Chemistry*. 2011;286(15):12933–12943.
121. Patil I, Sancheti H, Stiles BL, Cadenas E. Brain metabolic and functional alterations in a liver-specific pten knockout mouse model. *PloS One*. 2018;13(9):e0204043.
122. Li A, Qiu M, Zhou H. PTEN, insulin resistance and cancer. *Current Pharmaceutical Design*. 2017;23(25):3667–3676.
123. Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science (New York, N.Y.)*. 2004;306(5695):457–461.

124. Tan JTM, McLennan SV, Williams PF. Connective tissue growth factor/ccn-2 is upregulated in epididymal and subcutaneous fat depots in a dietary-induced obesity model. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*. 2013;304(12):E1291-1302.
125. Ohta K, Aoyama E, Ahmad SI. CCN2/ctgf binds the small leucine rich proteoglycan protein tsukushi. *Journal of Cell Communication and Signaling*. 2019;13(1):113–118.
126. Ungvari Z, Valcarcel-Ares MN, Tarantini S. Connective tissue growth factor (ctgf) in age-related vascular pathologies. *GeroScience*. 2017;39(5–6):491–498.
127. Wu Q, Jorgensen M, Song J. Members of the *cyr61/ctgf/nov* protein family: emerging players in hepatic progenitor cell activation and intrahepatic cholangiocarcinoma. *Gastroenterology Research and Practice*. 2016;2016:2313850.
128. Gahr S, Mayr C, Kiesslich T. The pan-deacetylase inhibitor panobinostat affects angiogenesis in hepatocellular carcinoma models via modulation of ctgf expression. *International Journal of Oncology*. 2015;47(3):963–970.
129. Wang LH, Tsai HC, Cheng YC. CTGF promotes osteosarcoma angiogenesis by regulating mir-543/angiopoietin 2 signaling. *Cancer Letters*. 2017;391:28–37.
130. Ubink I, Verhaar ER, Kranenburg O, Goldschmeding R. A potential role for *ccn2/ctgf* in aggressive colorectal cancer. *Journal of Cell Communication and Signaling*. 2016;10(3):223–227.
131. Li J, Ye L, Owen S. Emerging role of *ccn* family proteins in tumorigenesis and cancer metastasis (review). *International Journal of Molecular Medicine*. 2015;36(6):1451–1463.
132. Mendes FA, Coelho Aguiar JM, Kahn SA. Connective-tissue growth factor (ctgf/*ccn2*) induces astrogenesis and fibronectin expression of embryonic neural cells in vitro. *PloS One*. 2015;10(8):e0133689.
133. Oberauer R, Rist W, Lenter MC. EGFL6 is increasingly expressed in human obesity and promotes proliferation of adipose tissue-derived stromal vascular cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2010;343(1–2):257–269.



134. Bolton J, Montastier E, Carayol J. Molecular biomarkers for weight control in obese individuals subjected to a multiphase dietary intervention. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2017;102(8):2751–2761.
135. Noh K, Mangala LS, Han HD. Differential effects of egfl6 on tumor versus wound angiogenesis. *Cell Reports*. 2017;21(10):2785–2795.
136. Wang X, Yuan W. The somite-secreted factor maeg promotes zebrafish embryonic angiogenesis. *Oncotarget*. 2016;7(47):77749–77763.
137. Chim SM, Qin A, Tickner J. EGFL6 promotes endothelial cell migration and angiogenesis through the activation of extracellular signal-regulated kinase. *The Journal of Biological Chemistry*. 2011;286(25):22035–22046.
138. Wallace SE, Regalado ES, Gong L. MYLK pathogenic variants aortic disease presentation, pregnancy risk, and characterization of pathogenic missense variants. *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*. 2019;21(1):144–151.
139. Wang T, Brown ME, Kelly GT. Myosin light chain kinase (mylk) coding polymorphisms modulate human lung endothelial cell barrier responses via altered tyrosine phosphorylation, spatial localization, and lamellipodial protrusions. *Pulmonary Circulation*. 2018;8(2):2045894018764171.
140. Lin J, He Y, Chen L. MYLK promotes hepatocellular carcinoma progression through regulating cytoskeleton to enhance epithelial-mesenchymal transition. *Clinical and Experimental Medicine*. 2018;18(4):523–533.
141. Zhong Z, Huang M, Lv M. Circular rna mylk as a competing endogenous rna promotes bladder cancer progression through modulating vegfa/vegfr2 signaling pathway. *Cancer Letters*. 2017;403:305–317.
142. Karbiener M, Glantschnig C, Pisani DF. Mesoderm-specific transcript (mest) is a negative regulator of human adipocyte differentiation. *International Journal of Obesity (2005)*. 2015;39(12):1733–1741.
143. Prudovsky I, Anunciado-Koza RP. Mesoderm-specific transcript localization in the er and er-lipid droplet interface supports a role in adipocyte hypertrophy. *J. Cell Biochem*. 2018;119(3):2636-2645.

144. El Hajj N, Pliushch G, Schneider E. Metabolic programming of mest dna methylation by intrauterine exposure to gestational diabetes mellitus. *Diabetes*. 2013;62(4):1320–1328.
145. Takahashi M, Kamei Y, Ezaki O. Mest/peg1 imprinted gene enlarges adipocytes and is a marker of adipocyte size. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*. 2005;288(1):E117-124.
146. Kamei Y, Suganami T, Kohda T. Peg1/mest in obese adipose tissue is expressed from the paternal allele in an isoform-specific manner. *FEBS letters*. 2007;581(1):91–96.
147. Stohn JP, Wang Q, Siviski ME. Cthrc1 controls adipose tissue formation, body composition, and physical activity. *Obesity (Silver Spring, Md.)*. 2015;23(8):1633–1642.
148. Zheng M, Zhou Q, Liu X. CTHRC1 overexpression promotes cervical carcinoma progression by activating the wnt/pcp signaling pathway. *Oncology Reports*. 2019;41(3):1531–1538.
149. Cui XX, Ding HM, Gu F. Inhibition of cthrc-1 by its specific monoclonal antibody attenuates cervical cancer cell metastasis. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*. 2019;110:758–763.
150. Ganguly SS, Daft PG, Cao J. Loss of myeloid-specific tgf- $\beta$  signaling decreases cthrc1 to downregulate bfgf and the development of h1993-induced osteolytic bone lesions. *Cancers*. 2018;10(12):463.
151. He W, Zhang H, Wang Y. CTHRC1 induces non-small cell lung cancer (nslc) invasion through upregulating mmp-7/mmp-9. *BMC cancer*. 2018;18(1):400.
152. Hu X, Zhai Y, Shi R. FAT1 inhibits cell migration and invasion by affecting cellular mechanical properties in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncology Reports*. 2018;39(5):2136–2146.
153. Madan E, Dikshit B, Gowda SH. FAT1 is a novel upstream regulator of hif1 $\alpha$  and invasion of high grade glioma. *International Journal of Cancer*. 2016;139(11):2570–2582.
154. Valletta D, Czech B, Spruss T. Regulation and function of the atypical cadherin fat1 in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis*. 2014;35(6):1407-15.

155. Guan H, Zhang Y, Gao S. Differential patterns of secreted frizzled-related protein 4 (sfrp4) in adipocyte differentiation: adipose depot specificity. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*. 2018;46(5):2149–2164.
156. Mastaitis J, Eckersdorff M, Min S. Loss of sfrp4 alters body size, food intake, and energy expenditure in diet-induced obese male mice. *Endocrinology*. 2015;156(12):4502–4510.
157. Almario RU, Karakas SE. Roles of circulating wnt-signaling proteins and wnt-inhibitors in human adiposity, insulin resistance, insulin secretion, and inflammation. *Hormone and Metabolic Research = Hormon- Und Stoffwechselforschung = Hormones Et Metabolisme*. 2015;47(2):152–157.
158. Kamili A, Roslan N, Frost S. TPD52 expression increases neutral lipid storage within cultured cells. *Journal of Cell Science*. 2015;128(17):3223–3238.
159. Kato K, Mukudai Y, Motohashi H. Opposite effects of tumor protein d (tpd) 52 and tpd54 on oral squamous cell carcinoma cells. *International Journal of Oncology*. 2017;50(5):1634–1646.
160. Lechuga S, Amin PH, Wolen AR, Ivanov AI. Adducins inhibit lung cancer cell migration through mechanisms involving regulation of cell-matrix adhesion and cadherin-11 expression. *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Cell Research*. 2019;1866(3):395–408.
161. Kiang KMY, Leung GKK. A review on adducin from functional to pathological mechanisms: future direction in cancer. *BioMed Research International*. 2018; 2018:3465929.
162. Gonçalves S, Patat J, Guida MC. A homozygous kat2b variant modulates the clinical phenotype of add3 deficiency in humans and flies. *PLoS genetics*. 2018;14(5):e1007386.
163. Auf G, Jabouille A, Delugin M. High epiregulin expression in human u87 glioma cells relies on ire1 $\alpha$  and promotes autocrine growth through egf receptor. *BMC cancer*. 2013;13:597.

164. Glantz SA. Primer of biostatistics. New York : McGraw-Hill, Health Professions Division. 1997; 473.
165. Graupera M, Claret M. Endothelial cells: new players in obesity and related metabolic disorders. Trends in endocrinology and metabolism: TEM. 2018;29(11):781–794.
166. Somodi S, Seres I, Lőrincz H. Plasminogen activator inhibitor-1 level correlates with lipoprotein subfractions in obese nondiabetic subjects. International Journal of Endocrinology. 2018;2018:9596054.
167. Ahirwar AK, Jain A, Goswami B. Imbalance between protective (adiponectin) and prothrombotic (plasminogen activator inhibitor-1) adipokines in metabolic syndrome. Diabetes & Metabolic Syndrome. 2014;8(3):152–155.
168. Tan JTM, McLennan SV, Song WW. Connective tissue growth factor inhibits adipocyte differentiation. American Journal of Physiology. Cell Physiology. 2008;295(3):C740-751.
169. Gonzalez FJ, Xie C, Jiang C. The role of hypoxia-inducible factors in metabolic diseases. Nature Reviews. Endocrinology. 2018;15(1):21–32.
170. Takikawa A, Mahmood A, Nawaz A. HIF-1 $\alpha$  in myeloid cells promotes adipose tissue remodeling toward insulin resistance. Diabetes. 2016;65(12):3649–3659.
171. Engin A. Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on preadipocytes and macrophages: hypoxia hypothesis. Advances in Experimental Medicine and Biology. 2017;960:305–326.
172. Mejhert N, Galitzky J, Pettersson AT. Mapping of the fibroblast growth factors in human white adipose tissue. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 2010;95(5):2451–2457.
173. Kim S, Ahn C, Bong N. Biphasic effects of fgf2 on adipogenesis. PloS One. 2015;10(3):e0120073.
174. Nosaka M, Ishida Y, Kimura A. Contribution of the tnf- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ )-tnf-rp55 (tumor necrosis factor receptor p55) axis in the resolution of venous thrombus. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 2018;38(11):2638–2650.

175. Ito S, Iwaki S, Koike K. Increased plasma sphingosine-1-phosphate in obese individuals and its capacity to increase the expression of plasminogen activator inhibitor-1 in adipocytes. *Coronary Artery Disease*. 2013;24(8):642–650.
176. Bellou S, Hink MA, Bagli E. VEGF autoregulates its proliferative and migratory erk1/2 and p38 cascades by enhancing the expression of dusp1 and dusp5 phosphatases in endothelial cells. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*. 2009;297(6):C1477-1489.
177. Lombardi A, Ulianich L, Treglia AS. Increased hexosamine biosynthetic pathway flux dedifferentiates ins-1e cells and murine islets by an extracellular signal-regulated kinase (erk)1/2-mediated signal transmission pathway. *Diabetologia*. 2012;55(1):141–153.
178. Piya S, Kim JY, Bae J. DUSP6 is a novel transcriptional target of p53 and regulates p53-mediated apoptosis by modulating expression levels of bcl-2 family proteins. *FEBS letters*. 2012;586(23):4233–4240.
179. Li JP, Fu YN, Chen YR, Tan TH. JNK pathway-associated phosphatase dephosphorylates focal adhesion kinase and suppresses cell migration. *The Journal of Biological Chemistry*. 2010;285(8):5472–5478.
180. Dean SJR, Perks CM, Holly JMP. Loss of pten expression is associated with igfbp2 expression, younger age, and late stage in triple-negative breast cancer. *American Journal of Clinical Pathology*. 2014;141(3):323–333.
181. De Pergola G, Silvestris F. Obesity as a major risk factor for cancer. *Journal of Obesity*. 2013;2013:291546.
182. Kinashi H, Falke LL, Nguyen TQ. Connective tissue growth factor regulates fibrosis-associated renal lymphangiogenesis. *Kidney International*. 2017;92(4):850–863.
183. Kuiper EJ, Van Nieuwenhoven FA. The angio-fibrotic switch of vegf and ctgf in proliferative diabetic retinopathy. *PLoS ONE*. 2008;3(7):e2675.
184. Jiao C, Elliott D, Spee C. APOPTOSIS and angiofibrosis in diabetic tractional membranes after vascular endothelial growth factor inhibition: results of a prospective trial. report no. *Retina (Philadelphia, Pa.)*. 2019;39(2):265–273.

185. Junge KM, Leppert B, Jahreis S. MEST mediates the impact of prenatal bisphenol a exposure on long-term body weight development. *Clinical Epigenetics*. 2018;10:58.
186. Anunciado-Koza RP, Manuel J, Mynatt RL. Diet-induced adipose tissue expansion is mitigated in mice with a targeted inactivation of mesoderm specific transcript (mest). *PloS One*. — 2017. — Vol. 12, No. 6. — P. e0179879.
187. Zheng C, Yang Q, Xu C. CD11b regulates obesity-induced insulin resistance via limiting alternative activation and proliferation of adipose tissue macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015;112(52):E7239-7248.
188. Xia S, Sha H, Yang L. Gr-1+ cd11b+ myeloid-derived suppressor cells suppress inflammation and promote insulin sensitivity in obesity. *The Journal of Biological Chemistry*. 2011;286(26):23591–23599.
189. An T, Zhang Z, Li Y. Integrin  $\beta$ 1-mediated cell–cell adhesion augments metformin-induced anoikis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(5):1161.
190. Mahdi T, Hänzelmann S, Salehi A. Secreted frizzled-related protein 4 reduces insulin secretion and is overexpressed in type 2 diabetes. *Cell Metabolism*. 2012;16(5):625–633.
191. Rada I, Deldicque L, Francaux M, Zbinden-Foncea H. Toll like receptor expression induced by exercise in obesity and metabolic syndrome: a systematic review. *Exercise Immunology Review*. 2018;24:60–71.
192. Pahwa R, Jialal I. The role of the high-mobility group box1 protein-toll like receptor pathway in diabetic vascular disease. *Journal of Diabetes and Its Complications*. 2016;30(6):1186–1191.
193. Jang HJ, Kim HS, Hwang DH. Toll-like receptor 2 mediates high-fat diet-induced impairment of vasodilator actions of insulin. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*. 2013;304(10):E1077-1088.
194. Liao SB, Wong PF. Effects of adrenomedullin on tumour necrosis factor alpha, interleukins, endothelin-1, leptin, and adiponectin in the epididymal fat and soleus muscle of the rat. *Hormone and Metabolic Research = Hormon- Und Stoffwechselforschung = Hormones Et Metabolisme*. 2013;45(1):31–37.

195. Di Liddo R, Bridi D, Gottardi M. Adrenomedullin in the growth modulation and differentiation of acute myeloid leukemia cells. *International Journal of Oncology*. 2016;48(4):1659–1669.
196. Zhang SY, Lv Y, Zhang H. Adrenomedullin 2 improves early obesity-induced adipose insulin resistance by inhibiting the class ii mhc in adipocytes. *Diabetes*. 2016;65(8):2342–2355.
197. Zhang H, Zhang SY, Jiang C. Intermedin/adrenomedullin 2 polypeptide promotes adipose tissue browning and reduces high-fat diet-induced obesity and insulin resistance in mice. *International Journal of Obesity (2005)*. 2016;40(5):852–860.
198. Tsuchihara K, Tsutomu O. Susceptibility of snark- deficient mice to azoxymethane-induced colorectal tumorigenesis and the formation of aberrant crypt foci. *Cancer Sci*. 2008;99(4):677-682.
199. Баулина НМ, Кулакова ОГ. МикроРНК: роль в развитии аутоиммунного воспаления. *Acta nature*. -2016;8(1):23.
200. Liu X, Gong J, Xu B. MiR-143 down-regulates tlr2 expression in hepatoma cells and inhibits hepatoma cell proliferation and invasion. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 2015;8(10):12738–12747.
201. Ortega FJ, Moreno-Navarrete JM, Pardo G. MiRNA expression profile of human subcutaneous adipose and during adipocyte differentiation. *PloS One*. 2010;5(2):e9022.
202. Hannafon BN, Carpenter KJ, Berry WL. Exosome-mediated microrna signaling from breast cancer cells is altered by the anti-angiogenesis agent docosahexaenoic acid (dha). *Molecular Cancer*. 2015;14:133.
203. Ghalali A, Högberg J, Stenius U. Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 (pten) and ph domain and leucine-rich repeat phosphatase cross-talk (phlpp) in cancer cells and in transforming growth factor  $\beta$ -activated stem cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 2014;289(17):11601–11615.

**ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ  
ДИСЕРТАЦІЇ**

1. Minchenko O.H., **Viletska Y. M.**, Minchenko D. O., Davydov V. V. Insulin resistance modifies the expression of proliferation related genes in obese adolescents and adult men. *Ukr Biochem J.* 2019, 91(3): 65-77. Scopus
2. Minchenko D. O., **Bashta Y. M.**, Ratushna O. O., Minchenko O. H. Glucose tolerance in obese men is associated with dysregulation of some angiogenesis-related gene expressions in subcutaneous adipose tissue. *Fiziol. Zh.*, 2016; 62(2): 12-23. Scopus.
3. Minchenko O.H., **Bashta Y.M.**, Minchenko D.O., Kovalevska O.V., Kulinich A.O. Expression of genes, which participate in the control cell proliferation, in subcutaneous adipose tissue of the obese men with glucose intolerance. *Appl. Cell Biol.*, 2014, 3 (4), 120-128.
4. **Башта Ю.М.**, Герасименко Р.М, Глушак Н., Мінченко О.Г. Експресія факторів проліферації у підшкірній жировій тканині чоловіків за ожиріння. *Вісник КНУ імені Тараса Шевченка. Проблеми регуляції фізіологічних функцій*, 2014, 17: 21-25.
5. Мінченко Д.О., **Вілецька Ю.М.**, Давидов В.В., Мінченко О.Г. Експресія генів TLR2, TLR4, TNFA та ADD3 у підлітків і дорослих чоловіків з ожирінням за умови різної чутливості до інсуліну. *Сучасна педіатрія*, 2017, 6(86): 147-152.
6. Ratushna O., Minchenko D., **Bashta Y.**, Herasyumenko R., Minchenko O. The expression of TIMP1, TIMP2, VCAN, SPARC, CLEC3B and E2F1 in subcutaneous adipose tissue of obese males and glucose intolerance. *CellBio.* 2013 2(2): 25-33.
7. **Bashta Y.M.**, Minchenko D.O., Bova D.O., Kovalevska O.V., Minchenko O.H. Expression of protein phosphatase DUSP genes in subcutaneous adipose tissue of obese men with normal and impairment glucose tolerance. *Biol. Systems*, 2014, 6 (1): 3-9.
8. **Viletska Y.M.**, Angiogenesis-related gene expressions in subcutaneous adipose tissue. *Young scientists conference: Modern aspects of biochemistry and biotechnology –*



2019. Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, 21-22 March, 2019, Kyiv. Ukr. Biochem. J., 2019, 91(2): 82.

9. **Башта Ю.**, Мінченко Д. Експресія генів PTEN та родини протеїнофосфатаз DUSP у підшкірній жировій тканині чоловіків за ожиріння з нормальною і порушеною толерантністю до глюкози. Молодь і поступ біології. XI Міжнародна наукова конф. студ. і аспір. Збірник тез. Львів, Сполом, 2015: 53-54.
10. Ratushna O.O., Minchenko D.O., **Bashta Y.M.**, Minchenko O.H. Expression of anti-proliferative genes in subcutaneous adipose tissue of obese males and glucose intolerance. FEBS EMBO Conference: 30 August-4 September, Paris, France, 2014: FEBS J. – 281, Suppl. 1: 563.
11. Ратушна О.О., **Башта Ю.М.**, Мінченко О.Г. Збільшення експресії факторів росту у підшкірній жировій тканині у чоловіків з ожирінням і порушенням толерантності до глюкози. Матеріали XI Укр. біохім. конгресу, 6-10 жовтня 2014, Київ. Ukr. Biochem. J., 2014; 86, N 5 (Suppl.1), 197.
12. **Башта Ю.М.**, Мінченко О.Г. Експресія факторів проліферації у підшкірній жировій тканині чоловіків за ожиріння. X Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів „Молодь і поступ біології”, Збірник тез. Львів, 8-11 квітня 2014 року, Львів, СПОЛОМ, 2014, с. 205-206.
13. **Bashta Y.M.**, Minchenko O.H. Expression of growth factors in subcutaneous fat tissue in men with obesity and glucose intolerance. XII International Scientific Conference of Students and Young Scientists. Shevchenkivska Vesna: Life Sciences, March 25-28, Kyiv 2014, 15-16.
14. Мінченко О.Г., Кривдюк І.В., Харькова А.П., **Башта Ю.М.**, Мінченко Д.О. Роль стресу ендоплазматичного ретикулума в нормі та за патологічних станів. 2-га Міжнародна наукова конференція “Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології, Дніпропетровськ, 24-25 вересня 2013, Дніпропетровськ, 2013, 43.
15. Мінченко О.Г., **Башта Ю.М.**, Мінченко Д.О., Компанієць Д.О. Молекулярні механізми розвитку ожиріння та його ускладнень. Актуальні питання біології,

екології, медицини та фармакології. Дніпропетровськ, 26-27 вересня 2013, Харків, НВФ Екограф, 2013, 72-73.

16. Ratushna O., Minchenko D., **Bashta Y.**, Minchenko O. Expression of HK2, IRS1, PFKFB and circadian genes in subcutaneous adipose tissue in obesity, glucose intolerance and type 2 diabetes. The 7th International Conference of Young Naturalists. From Biotechnology to Environmental Protection. The interdisciplinary meeting of young naturalists. November 8-10, 2012, Zielona Gora, Poland, 2012, P. 101-102.