

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ім. О. В. ПАЛЛАДИНА**

**ВІЛЕЦЬКА ЮЛІЯ МИКОЛАЇВНА**



УДК 577.112.7:616

**ЕКСПРЕСІЯ ГЕНІВ, ЯКІ КОНТРОЛЮЮТЬ ПРОЦЕСИ ПРОЛІФЕРАЦІЇ,  
У ПІДШКІРНІЙ ЖИРОВІЙ ТКАНИНІ ЗА УМОВ ОЖИРІННЯ**

**03.00.04 – біохімія**

**Автореферат**  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

Київ – 2019

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у відділі молекулярної біології Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України та на кафедрі біохімії ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

**Науковий керівник:** доктор біологічних наук, професор,  
член-кореспондент НАН України  
**Мінченко Олександр Григорович,**  
завідувач відділу молекулярної біології  
Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України

**Офіційні опоненти:**

доктор біологічних наук, доцент  
**Калачнюк Лілія Григорівна,**  
професор кафедри біохімії і фізіології  
тварин ім. акад. М.Ф. Гулого  
Національного університету біоресурсів і  
природокористування України

доктор біологічних наук, старший науковий співробітник  
**Телегєєв Геннадій Дмитрович,**  
завідувач відділу молекулярної генетики  
Інституту молекулярної біології і генетики НАН України

Захист відбудеться «28 жовтня» 2019 р. о 14<sup>00</sup> годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.240.01 в Інституті біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України за адресою: 01030, Київ, вул. Леонтовича, 9.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України (Київ, вул. Леонтовича, 9).

Автореферат розісланий «10» вересня 2019 р.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради,  
кандидат біологічних наук



Н.П. Карлова

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Розуміння молекулярних механізмів регуляції різних біохімічних процесів як у окремих клітинах, так і цілого організму є надзвичайно важливим напрямком біохімічних досліджень за різних патологічних станів, зокрема за ожиріння. Ріст жирової тканини обумовлений численними факторами: збільшеним споживанням їжі, малорухливим способом життя, не якісною їжею, інтоксикацією організму, які призводять до збільшення маси тіла та порушень метаболізму. Ожиріння є великою проблемою сьогодення, оскільки супроводжується такими ускладненнями як резистентність до інсуліну, діабет 2 типу, атеросклероз, злоякісні новоутворення, а це призводить до зниження тривалості життя. Зміни умов життя, що відбулися за останні п'ятдесят років сприяли глобальній пандемії ожиріння, яке супроводжується метаболічними ускладненнями і вимагає тривалого лікування [Konige M., 2014; Bass R. and Eneli I., 2015; Мінченко Д.О., 2015; Ghaben A.L., Scherer P.E., 2019]. Саме тому ця робота присвячена дослідженню важливих регуляторних факторів, які контролюють процеси адипогенезу та ангиогенезу, а також чутливість до інсуліну, для в'яснення молекулярних механізмів розвитку ожиріння і його метаболічних ускладнень, що важливо для пошуку принципово нових шляхів профілактики та лікування.

Стрес, спричинений збільшенням жирової тканини і порушенням метаболічних процесів в організмі, помітно відбивається на функціональному стані ендоплазматичного ретикулула (ER). Ця дисфункція ER призводить до порушення імунного захисту, тим самим сприяючи розвитку резистентності до інсуліну [Lee J. and Ozcan U., 2014; Minchenko D.O., 2015, 2019].

Ангиогенез є важливим компенсаторним механізмом розростання жирової тканини. Під час розвитку ожиріння ангиогенна активність жирової тканини збільшується. Як тільки вага тіла людини з ожирінням досягає стабільного рівня, швидкість росту судин у жировій тканині знижується внаслідок зменшення рівня про-ангиогенних факторів, зокрема VEGF (ендотеліального фактора росту судин), який індукується гіпоксією на початковому етапі ожиріння, а також факторами FGF1 (фактором росту фібробластів 1) та PDGF (тромбоцитарним фактором росту), причому активність останнього частково залежить і від VEGF [Pang C., 2008; Hassan B.B., 2017; Yin X., 2019]. Ожиріння характеризується системним запаленням та протромботичним станом, що підвищує ризик серцево-судинних захворювань. Зв'язок між ожирінням, пригніченням фібринолізу і підвищеним рівнем PAI-1 (SERPINE1), який має й неканонічні функції, розглядається як важливий компонент розвитку протромботичного стану [Coudriet G.M., 2019]. Збільшений рівень PAI-1 за ожиріння пов'язаний з високим рівнем лептину, який залучений до активації та агрегації тромбоцитів, а також внутрішньосудинного тромбозу [Singh P., 2010; Basurto Acevedo L., 2018].

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 МАРК [Jung., 2014]. Шлях МАРК направлений на стимулювання мітогенних та ростових ефектів інсуліну, а РІЗК-АКТ / РКВ є важливим для більшості метаболічних дій інсуліну. МАР кінази регулюють метаболічний гомеостаз шляхом фосфорилування факторів транскрипції, які контролюють такі процеси, як адипогенез, сигналювання інсуліну, поглинання глюкози, метаболізм жирних кислот і ліпогенез. DUSP фосфатази є негативними регуляторами МАР кіназ та контролюють клітинну диференціацію і проліферацію [Lawan A., 2013; Jiao H., 2015; Chen H.F., 2019].

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

#### **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.) та 7th Framework Program of European Commission project “LipidomicNet”, № 202272 (2007-2012 рр.), 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 рр.).

**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 і резистентності до інсуліну для в'ясування їх ролі в розвитку ожиріння та його метаболічних ускладнень, а також виявлення можливої кореляції між змінами в експресії цих генів та індексу маси тіла (BMI).

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 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 ожиріння та резистентності до інсуліну.

**Методи дослідження.** Дослідження проведено на підшкірній жировій тканині, яку взято з підшкірної жирової тканини чоловіків віком біля 45 років. У роботі використано методи виділення РНК із жирової тканини, спектрофотометричні методи визначення кількості РНК та їх спектральних характеристик, синтезу комплементарних ДНК, полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі для визначення рівня експресії генів ключових ензимів, транскрипційних та регуляторних факторів, а також комп'ютерний аналіз результатів, отриманих за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції. Всі дані наведено як середнє арифметичне значення  $\pm$  стандартне квадратичне відхилення ( $M \pm m$ ). Отримані в процесі виконання роботи експериментальні дані обраховано методами статистичної обробки результатів та кореляційного аналізу в програмах Excel та Origin 7. Статистичний аналіз нормально розподілених груп проводили за допомогою *t*-тесту. (Гланц С. Медико-биологическая статистика. Пер. с Англ.; 1999). В усіх випадках достовірною вважалася різниця між групами при  $p \leq 0,05$ .

**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*, *PLAT*, *PLAU*, *PLAUR*, *SERPINE1* 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 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*, *HSPA5/BiP* та *TNF* порівняно з контролем, а порушення толерантності до глюкози впливає лише на рівень експресії генів *CTHRC1*, *ADM*, *SFRP4*, *TNF* і *EGFL6*: знижує *EGFL6* та *ADM* і підвищує *SFRP4* та *TNF*. За допомогою біоінформаційного аналізу в мРНК *EGFL6*, *SERPINE1*, *PTEN*, *ITGAM*, *CTHRC1*, *TLR2*, *PLAU* і *PLAUR* виявлено сайти зв'язування мікроРНК *miR-7*, *miR-19a*, *miR-21*, *miR-143*, *miR-145* та *miR-190b* і встановлено, що у підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням та нормальною толерантністю до глюкози знижується рівень експресії мікроРНК *miR-7*, *miR-21*, *miR-143*, *miR-145* і *miR-190b*, а *miR-19a* – підвищується. Отримані результати вказують на важливу роль змін в експресії ключових регуляторних генів у розвитку ожиріння та його метаболічних ускладнень шляхом репрограмування геному.

**Практичне значення отриманих результатів** полягає у з'ясуванні можливих молекулярних механізмів розвитку ожиріння та його ускладнень, зокрема резистентності до інсуліну і порушення ангиогенезу, які вказують на зв'язок ожиріння та резистентності до інсуліну із сигнальними системами клітини, що контролюють процеси проліферації і виживання клітин, а це необхідно 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 та ензими ангиогенезу і проліферації, що контролюють метаболізм, у дорослих чоловіків з ожирінням та нормальною або 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 здійснені за участі наукового керівника, члена-кореспондента НАН України, д.б.н., проф. Мінченка О.Г.

**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.

конгрес, 6-10 жовтня 2014, Київ; XI Міжнародна наукова конф. студ. і аспір. Збірник тез. Львів, Сполом, 2015; Конференція-конкурс молодих учених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2019», Київ, 2019.

**Публікації.** За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 7 статей в 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.

**Структура та обсяг 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.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

### Огляд літератури

В огляді літератури представлено сучасні відомості про молекулярні механізми регуляції експресії генів, що кодують ключові фактори ангіогенезу та проліферації, а також протеїнфосфатази родини DUSP, у підшкірній жировій тканині чоловіків за умов ожиріння та резистентності до інсуліну для виявлення можливої кореляції між змінами індексу маси тіла (BMI) і рівнем експресії цих генів. Проаналізовано роль цих генів у процесах ангіогенезу та адипогенезу у підшкірній жировій тканині. Особлива увага приділена процесам регуляції метаболізму сигнальними шляхами, фібринолізу, ангіогенезу та факторам росту в процесі диференціювання адипоцитів. Окремий підрозділ присвячений глобальній проблемі ожиріння людства, а також стресу ER за ожиріння.

### Матеріали та методи досліджень

Експерименти проводили 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 чоловіків без ознак ожиріння (індекс маси тіла  $23 \pm 0.6$  кг/м<sup>2</sup>), 2) група чоловіків з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози (індекс маси тіла  $32 \pm 0.6$  кг/м<sup>2</sup>) і 3) група чоловіків з ожирінням, що мали порушену толерантність до глюкози (індекс маси тіла  $34 \pm 0.6$  кг/м<sup>2</sup>). 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.

Тотальну РНК із жирової тканини виділяли за допомогою спеціального набору реагентів (RNasy Lipid Tissue Mini Kit (QIAGEN, Німеччина) згідно протоколу виробника. Концентрацію виділеної РНК вимірювали на безкюветному спектрофотометрі NanoDrop ND-1000 (*Thermo Fisher Scientific*, США) при довжині хвилі 260 нм, крім того визначали спектральні характеристики цих РНК. Експресію мРНК різних ангіогенних і ростових факторів, а також багатьох інших

генів досліджували методами зворотної транскрипції та полімеразної ланцюгової реакції [Auf et al., 2013]. Набір „QuantiTect Reverse Transcription” (QIAGEN, Німеччина) і тотальну РНК із підшкірної жирової тканини використовували для синтезу комплементарної ДНК, в якому передбачено етап, що забезпечує елімінацію можливих залишків геномної ДНК. Рівень експресії генів досліджували методом 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 Absolute QPCR SYBR Green Mix (Thermo Fisher Scientific, Великобританія) та пари праймерів, специфічних для кожного гена, що були отримані із компанії Sigma-Aldrich (США).

Визначення рівня мікроРНК в препаратах РНК проводили за допомогою полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі (qRT-PCR). Спочатку проводили поліаденілювання мікроРНК за допомогою поліА-полімерази, потім зворотну транскрипцію поліаденільованої miRNA для отримання кДНК і на останньому етапі було проведено визначення мікроРНК за допомогою полімеразної ланцюгової реакції з використанням двох праймерів: універсального, який поставляється з кожним набором, і прямого праймера, який є специфічним для кожної мікроРНК (Invitrogen, США).

Аналіз результатів кількісної полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі виконували за допомогою спеціальної комп’ютерної програми „Differential expression calculator”, а статистичний аналіз проводили із використанням пакету прикладних програм Origin 6.0 та Microsoft Excel 2007. Результати виражали як  $M \pm m$ . Різницю вважали достовірною при значенні  $p < 0,05$ .

### **Результати досліджень та їх обговорення**

**Експресія генів, що кодують ангіогенні фактори, у підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням і нормальною та порушеною толерантністю до глюкози.** Відомо, що розростання жирової тканини призводить до росту судинної мережі і цей процес індукується гіпоксією на первинному етапі, але у резистентних до інсуліну осіб у підшкірній жировій тканині зменшується щільність капілярів і кровоток внаслідок зниження експресії ангіогенних генів, а можливо і в результаті недостатньої ангіогенної реакції на гіпоксію [Graupera M., 2018]. Для кращого розуміння значення судинної мережі в розростанні жирової тканини важливими є дослідження експресії різних ангіогенних факторів у підшкірній жировій тканині за умов стабілізованого 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  $23 \pm 0.6$ ; рівень глюкози (глюкозо-толерантний тест, 2 год)  $5,5 \pm 0,26$ )), 2-га – з ожирінням та нормальною толерантністю до глюкози (індекс маси тіла  $32 \pm 0.6$ , рівень глюкози (глюкозо-толерантний тест, 2 год)  $5,31 \pm 0,88$ )), та 3-тя – з ожирінням і порушеною толерантністю до глюкози (індекс маси тіла  $34 \pm 0.6$ , рівень глюкози (глюкозо-толерантний тест, 2 год)  $7,83 \pm 0,36$ )).



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 цього гена, а інша пара – специфічні лише для *VEGF-A-189*. Із даних, представлених на рис. 1, видно, 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 знижується (на 49 %) у цій групі чоловіків з ожирінням. У той же час, у чоловіків з ожирінням, ускладненим порушеною толерантністю до глюкози, рівень експресії мРНК *VEGF-A* збільшується на 34 % порівняно з групою осіб із ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози, але залишається зниженим порівняно зі значеннями в контрольній групі, причому більш виражені зміни виявлені для сплайс-варіанту *VEGF-A-189* (рис. 1). Є дані, що дефіцит інсуліну призводить до *VEGF*-резистентності і 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 у порівнянні з контрольною групою та індексом маси тіла є чітка негативна кореляція:  $r = -0,91935$  і  $r = -0,96744$ , відповідно (рис. 2).

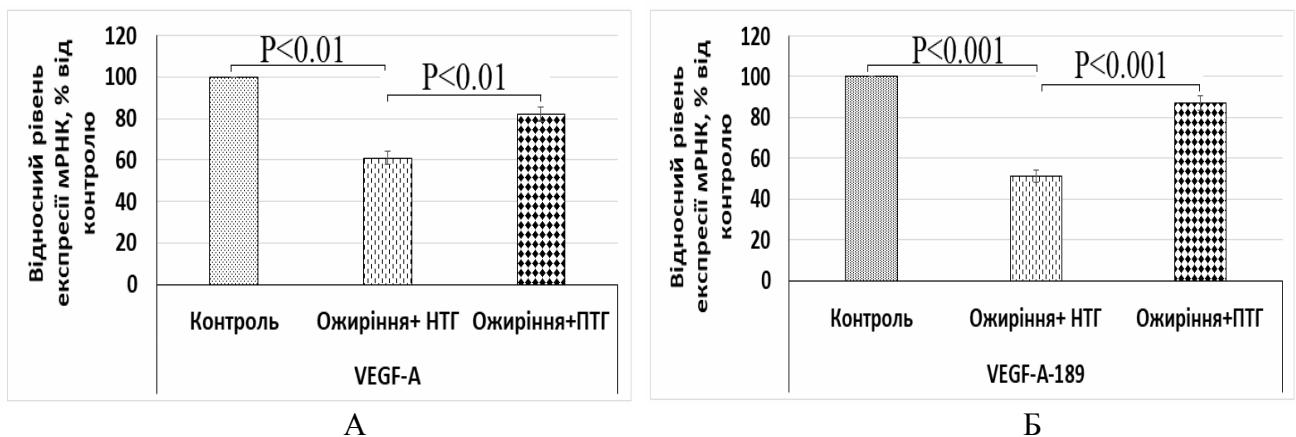


Рис. 1. Відносний рівень експресії мРНК *VEGF-A* (А) та його альтернативного сплайс-варіанту *VEGF-A-189* (Б) у підшкірній жировій тканині чоловіків без ознак ожиріння (Контроль), а також у осіб з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози (Ожиріння+НТГ) та ожирінням, ускладненим порушеною толерантністю до глюкози (Ожиріння+ПТГ). Тут та на наступних рисунках: величину експресії генів *VEGF-A* і *VEGF-A-189* нормалізували по експресії бета-актину, причому рівень експресії всіх досліджених генів у контролі був прийнятим за 100%; n = 6.

На рис. 3. продемонстровано, що ожиріння істотно впливає також на рівень експресії генів, що кодують синтез двох різних факторів росту фібробластів, у підшкірній жировій тканині, причому в протилежних напрямках: підвищує на 135 % рівень експресії гена *FGF1* і знижує на 36% рівень експресії гена *FGF2*. В той час, у підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням, ускладненим порушеною толерантністю до глюкози рівень експресії гена *FGF1* підвищується на 27 %, а рівень експресії гена *FGF2* – аж на 67 % (рис. 3). Проведений нами

кореляційний аналіз показав, що виявлені зміни в експресії генів *FGF1* та *FGF2* в групі чоловіків з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози у порівнянні з контрольною групою чітко корелюють зі змінами індексу маси тіла:  $r = 0,825585$ ;  $r = -0,87304$ .

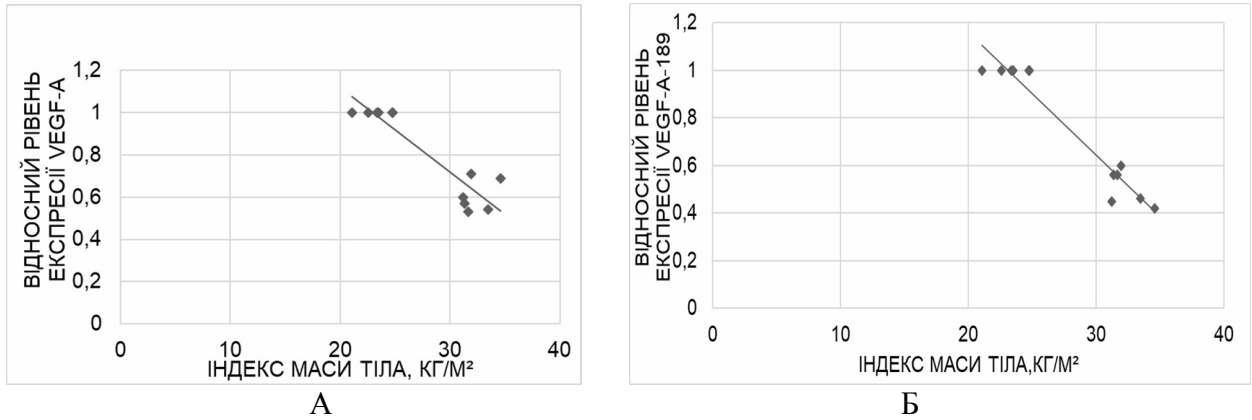


Рис. 2. Кореляційна залежність між зміною експресії генів *VEGF-A* (А) та *VEGF-A-189* (Б) у підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози та індексом маси тіла.

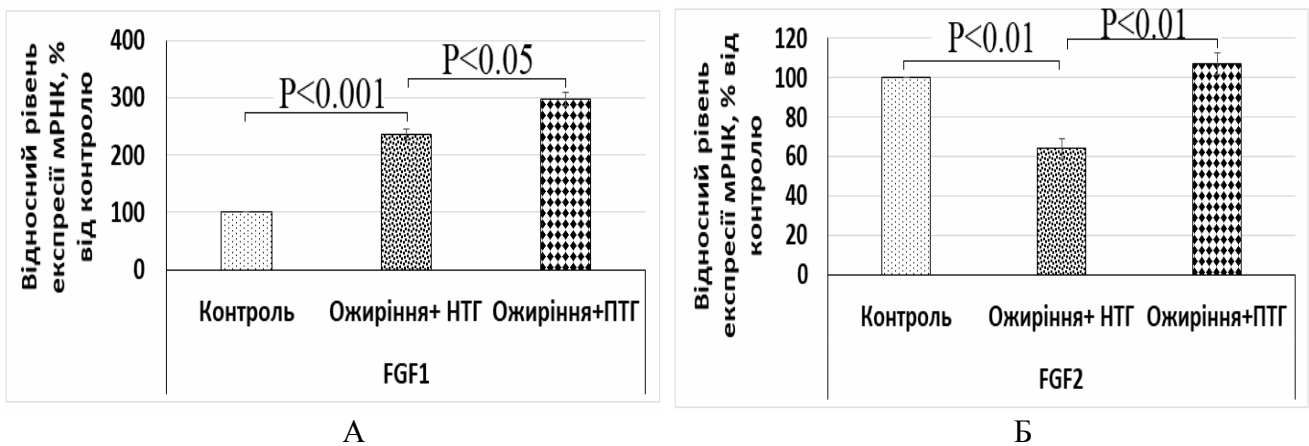


Рис 3. Відносний рівень експресії генів *FGF1* (А) та *FGF2* (Б) у підшкірній жировій тканині чоловіків без ознак ожиріння (Контроль), а також осіб з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози (Ожиріння+НТГ) та ожирінням, ускладненим порушеною толерантністю до глюкози (Ожиріння+ПТГ).

В наступних експериментах ми дослідили як виявлені зміни у експресії генів *FGF1* та *FGF2* узгоджуються зі змінами в експресії рецепторів цих факторів росту: *FGFR2* і *FGFRL1*. Встановлено, що рівень експресії гена *FGFR2*, який переважно взаємодіє як з *FGF1*, так і *FGF2*, і є відповідальним за ангіогенез, підвищується на 61 % у чоловіків з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози, порівняно з контролем (рис 4). Більше того, за умов ожиріння, ускладненого толерантністю до глюкози, рівень експресії мРНК *FGFR2* у підшкірній жировій тканині знижується на 20 % порівняно з групою чоловіків з ожирінням та нормальною толерантністю до глюкози (рис 4), що свідчить про залежність рівня експресії гена *FGFR2* від інсуліну.

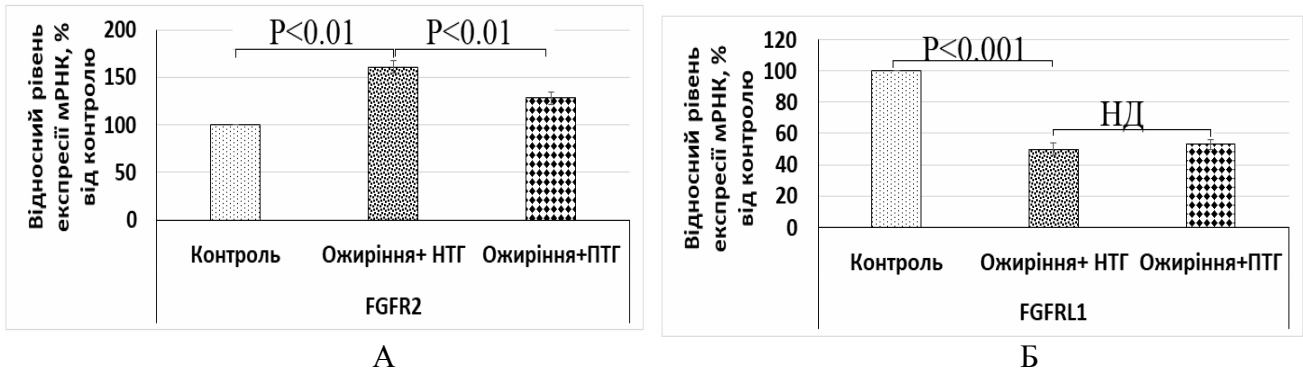


Рис. 4. Відносний рівень експресії генів *FGFR2* (А) та *FGFR1* (Б) у підшкірній жировій тканині чоловіків без ознак ожиріння (Контроль), а також осіб з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози (Ожиріння+НТГ) та ожирінням, ускладненим порушеною толерантністю до глюкози (Ожиріння+ПТГ), НД – не достовірно.

В той же час, рівень експресії гена *FGFR1*, іншого члена родини FGFR, знижується у чоловіків з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози на 50 % порівняно з контролем і ці результати узгоджуються з його біологічною функцією як потенційного регулятора FGF сигналізації, бо цей рецептор не має тирозинкінасної активності (рис. 4). Разом з тим, порушення толерантності до глюкози істотно не впливає на рівень експресії мРНК *FGFR1*, що вказує на відносну незалежність експресії цього гена від інсуліну.

На рис 5 представлені дані вивчення рівня експресії можливих регуляторів факторів росту фібробластів, зокрема транскрипційних факторів *HIF1A* та *EPAS1/HIF2A*, які опосередковують численні процеси, що змінюються за гіпоксії включаючи проліферацію, ангиогенез та диференціацію.

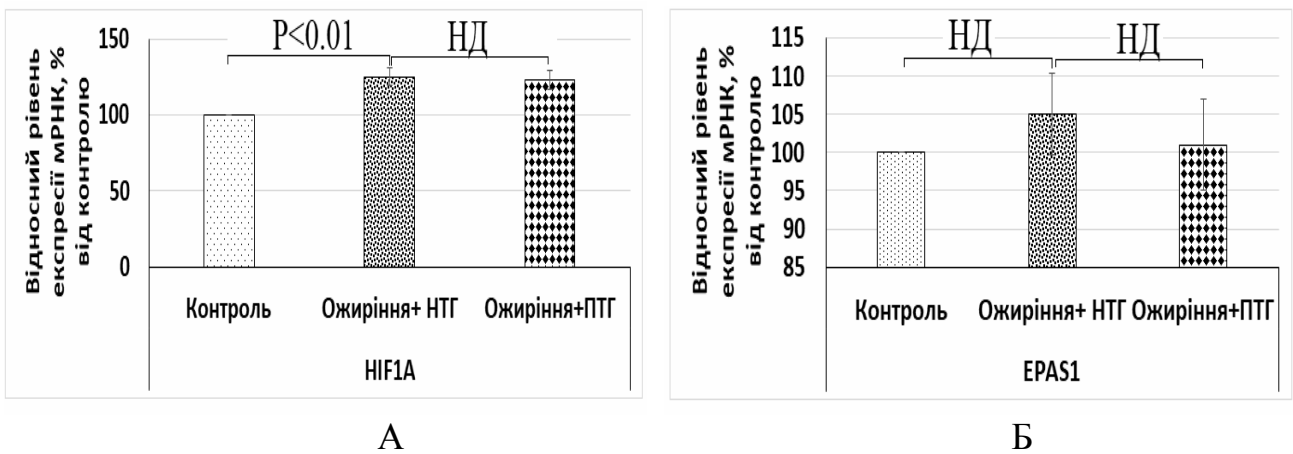


Рис. 5. Відносний рівень експресії генів *HIF1A* (А) та *EPAS1* (Б) у підшкірній жировій тканині чоловіків без ознак ожиріння (Контроль), а також у осіб з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози (Ожиріння+НТГ) та ожирінням, ускладненим порушеною толерантністю до глюкози (Ожиріння+ПТГ), НД – не достовірно.

Так, рівень експресії гена *HIF1A* у підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози підвищується на 25 % порівняно з контрольною групою. Однак, резистентність до інсуліну істотно не впливала на рівень експресії цього гена порівняно з групою чоловіків з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози (рис 5). Більше того, не було виявлено

істотних змін в експресії іншого HIF-альфа протеїну, EPAS / HIF2A, у підшкірній жировій тканині в обох групах чоловіків з ожирінням: як з нормальною, так і з порушеною толерантністю до глюкози, що свідчить про відносну незалежність експресії цього гена, як і *HIF1A*, від інсуліну.

Таким чином, проведеними дослідженнями встановлено, що експресія генів *VEGF-A* і *FGF2* в жировій тканині чоловіків знижується за умов ожиріння як з нормальною, так і з порушеною толерантністю до глюкози, а це відображає зниження інтенсивності ангіогенних процесів. Збільшений рівень експресії *FGF1* сприяє підвищенню життєздатності адипоцитів, а збільшення рівня експресії *FGFR2* може бути компенсаторним механізмом зниження *VEGF-A* і *FGF2*.

Ми також провели дослідження рівня 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. 6).

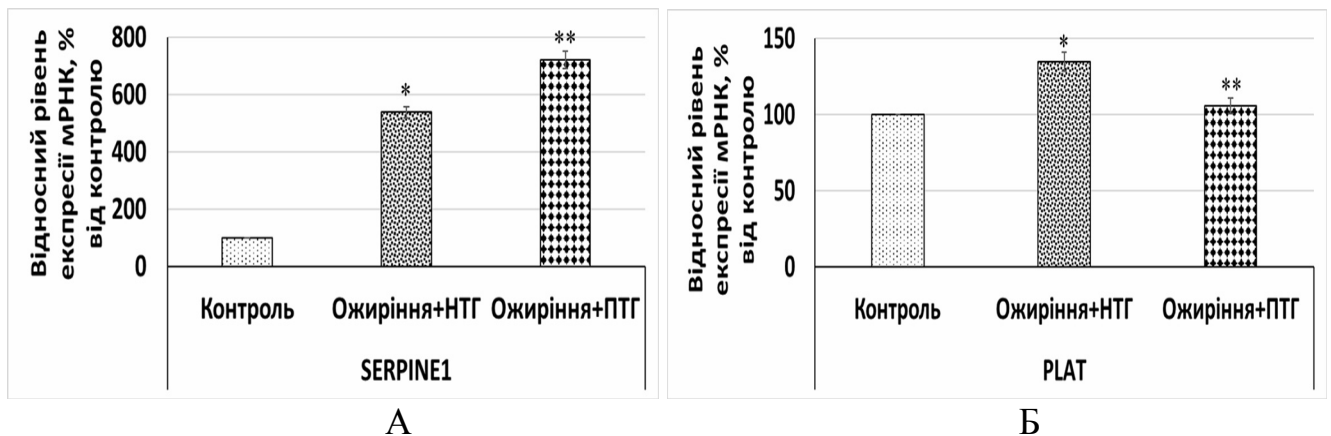


Рис. 6. Відносний рівень експресії генів *SERPINE1* (*PAI-1*) (А) та *PLAT* (Б) у підшкірній жировій тканині чоловіків без ознак ожиріння (Контроль), а також у осіб з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози (Ожиріння+НТГ) та ожирінням, ускладненим порушеною толерантністю до глюкози (Ожиріння+ПТГ), \* -  $P < 0,05$  у порівнянні з контролем; \*\* -  $P < 0,05$  у порівнянні групи з ожирінням й нормальною толерантністю до глюкози.

У той же час, у чоловіків з ожирінням, ускладненим порушеною толерантністю до глюкози, рівень експресії гена *PLAT* знижується 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 умов ожиріння, ускладненого резистентністю до інсуліну, порівняно з контрольною групою чоловіків.

Збільшення рівня експресії *PAI-1* (*SERPINE1*) може бути причетним як до росту жирової тканини, так і до дисфункції ендотелію та тромбоутворення [Ahirwar A. K., 2014]. Збільшення секреції цього адипокіна адипоцитами може бути відповіддю на гіперінсулінемію, яка спостерігається за умов резистентності до інсуліну, що узгоджується з даними Ahirwar A. K. [2014] щодо збільшеного рівня експресії *PAI-1* у осіб з ожирінням та метаболічним синдромом, причому погіршення чутливості до інсуліну сприяє розвитку протромботичному стану та

підвищує запалення. Кореляційний аналіз між змінами експресії генів *SERPINE1* і *PLAT* у групі чоловіків з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози та змінами індексу маси тіла показав наявність чіткої позитивної кореляції між цими показниками:  $r = 0,975282$ ;  $r = 0,73763$ .

Як показано на рис. 7, у підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням та нормальною толерантністю до глюкози підвищується рівень експресії гена *PLAU* на 25 % порівняно з контрольною групою, але за резистентності до інсуліну рівень експресії мРНК *PLAU* також зростає (на 43 % порівняно з контролем і на 15 % порівняно з групою чоловіків з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози).

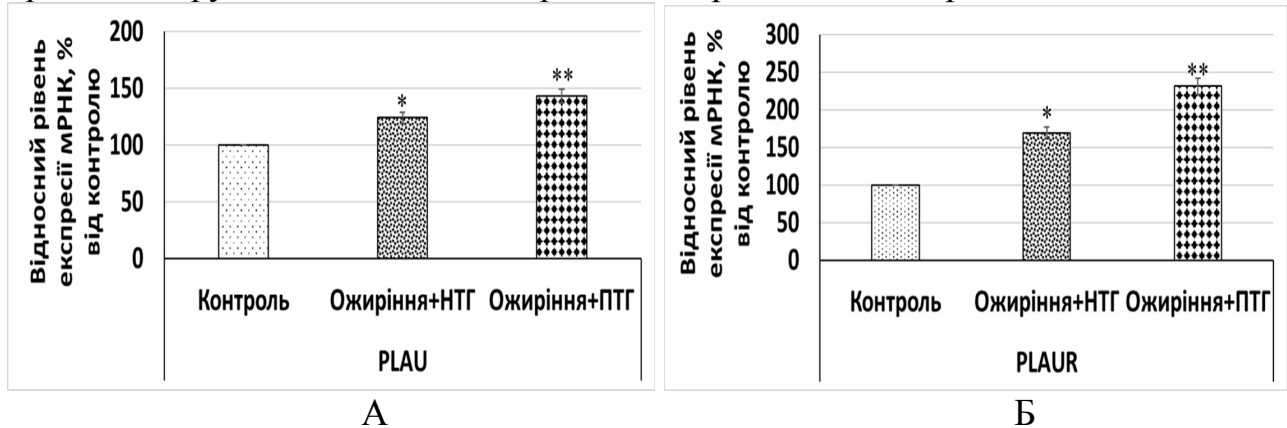


Рис. 7. Відносний рівень експресії генів *PLAU* та *PLAUR* у підшкірній жировій тканині чоловіків без ознак ожиріння (Контроль), а також осіб з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози (Ожиріння+НТГ) та ожирінням, ускладненим порушеною толерантністю до глюкози (Ожиріння+ПТГ), \* -  $P < 0,05$  у порівнянні з контролем; \*\* -  $P < 0,05$  у порівнянні групи з ожирінням й нормальною толерантністю до глюкози.

Важливо відзначити, що експресія гена *PLAUR* також підвищується на 69 % у чоловіків з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози порівняно з контролем. Однак, за ожиріння з резистентністю до інсуліну спостерігається більш виражене збільшення рівня 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 %) (рис. 7).

Таким чином, ці дослідження дозволяють зробити висновок про те, що за умов стабільного ожиріння в підшкірній жировій тканині чоловіків знижується рівень експресії потужних ангіогенних генів і виражено змінюється експресія генів, які кодують ключові регуляторні компоненти фібринолізу, а це вказує на порушення процесів ангіогенезу та фібринолітичної системи і можливості розвитку серцево-судинних захворювань.

**Експресія генів, що кодують протеїнофосфатази родини DUSP, у підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням і нормальною або порушеною толерантністю до глюкози.** Ожиріння часто призводить до резистентності до інсуліну та метаболічного синдрому, що обумовлено активацією відповіді 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 кінрази, активацію яких модулюють протеїнові MAPK-фосфатази, причому

вони є цікавими кандидатами для регулювання стресових реакцій, залучених до різних захворювань, що пов'язані з проліферативними процесами, включаючи ожиріння та його метаболічні ускладнення. В цьому дослідженні ми вивчали вплив ожиріння на рівень експресії різних генів 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.

Таблиця 1.

**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 (тут і далі): ↓ - рівень експресії знижується; ↑ - рівень експресії підвищується.

Встановлено, що рівень експресії генів протеїнфосфатаз родини *DUSP* та гена *PTEN* знижується за умов ожиріння й нормальної толерантності до глюкози порівняно з контролем, але у чоловіків з ожирінням і порушеною толерантністю до глюкози спостерігається не велике, але статистично значиме, підвищення рівня експресії різних протеїнфосфатаз у підшкірній жировій тканині. Цілком можливо, що ці зміни в експресії генів *DUSP* пов'язані з розвитком резистентності до інсуліну, але функціональне значення змін в експресії генів *DUSP* ще не повністю зрозуміле і потребує подальшого дослідження.

**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 адипогенез відбувається у відповідь на надлишок енергії в 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 [Tan J.T., 2008]. Проліферація адипоцитів є ключовим процесом, пов'язаним з патогенезом ожиріння і резистентності до інсуліну, причому у регуляції цього процесу бере участь велика кількість транскрипційних факторів.

Наші дослідження показали, що ожиріння асоціюється з підвищеним рівнем експресії генів, які кодують регуляторні фактори і які 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. Отримані результати показують, що ожиріння веде до значного підвищення рівня експресії таких генів як *CTGF*, *MYLK*, *MEST*, *TPD52*, *ITGAM*, *ITGB1*, *FAT*, *PPDPF*, *SFRP4*, *CTHRC1*, *EGFL6*, *TLR2* та *BIP* і зниження *TLR4* у підшкірній жировій тканині (табл.2).

Таблиця 2.

**Вплив ожиріння на регуляцію експресії генів *CTGF*, *MYLK*, *MEST*, *ITAG*, *ITGB1*, *FAT*, *PPDPF*, *SFRP4*, *CTHRC1*, *EGFL6*, *TLR2*, *TLR4*, *HSPA5/BiP* та *TNF*, які кодують фактори росту проліферації у підшкірній жировій тканині.**

Гени	Контроль	Ожиріння+НТГ	Ожиріння+ПТГ
<i>CTGF</i>	100%	↑ 434%	↑ 269%
<i>MYLK</i>	100%	↑ 58%	↑ 21 %
<i>MEST</i>	100%	↑ 41%	змін немає
<i>ITAG</i>	100%	↑ 51%	змін немає
<i>ITGB1</i>	100%	↑ 48%	змін немає
<i>FAT</i>	100%	↑ 72%	змін немає
<i>PPDPF</i>	100%	↑ 51%	змін немає
<i>SFRP4</i>	100%	↑ 299%	змін немає
<i>CTHRC1</i>	100%	↑ 151%	↑ 35%
<i>EGFL6</i>	100%	↑ 1144%	↑ 63%
<i>TLR2</i>	100%	↑ 12%	↑ 19%
<i>TLR4</i>	100%	↓ 17%	↓ 12%
<i>BIP</i>	100%	↑ 55%	↑ 72 %
<i>TNF</i>	100%	↑ 134%	↑ 153%

Результати цих досліджень узгоджуються з даними інших дослідників про участь цих генів у регуляції різних проліферативних процесів та ангиогенезі [De Pergola G., 2013]. А підвищення рівня експресії *HSPA5/BiP* вказує на наявність стресу ендоплазматичного ретикулума, оскільки він є стрес-залежним шапероном і задіяний не лише в розвитку ожиріння, а і в рості злоякісних пухлин, причому це може пояснити і підвищену схильність організмів з ожирінням до канцерогенезу.

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

В регуляції експресії генів важливу роль відіграють мікроРНК, які високоспецифічно зв'язуються з 3'-последовностями мРНК та ініціюють їх деградацію. У зв'язку з цим, нами проведено біоінформаційний аналіз последовностей мРНК досліджених генів на наявність в їх 3'-структурах можливих сайтів зв'язування мікроРНК (miR-7, miR-19a, miR-21, miR-143, miR-145 та miR-190), використовуючи програму "TargetScanHuman, Prediction of microRNA targets". Як видно із даних, представлених на рис. 8, біоінформаційний аналіз показав наявність сайтів зв'язування мікроРНК miR-145 в 3'- последовності 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, відомої 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-7 (let-7) (рис. 8).

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

Рис. 8. Сайти зв'язування мікроРНК miR-19a, miR-21, miR-143, miR-145, miR-190 та miR-7 з 3'-послідовностями мРНК SERPINE1, EGFL6, PTEN, ITGAM, PLAU, PLAUR, TLR2 та CTHRC1 за даними біоінформаційного аналізу в програмі "TargetScanHuman, Prediction of microRNA targets"

Проведеними дослідженнями виявлено у жировій тканині чоловіків з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози зниження рівня експресії мікроРНК miR-7, miR-21, miR-143, miR-145 та miR-190, які мають сайти зв'язування з 3'-ділянками мРНК SERPINE1, EGFL6, ITGAM, PLAU, PLAUR, TLR2 та CTHRC1, відповідно, причому зниження рівня експресії цих мікроРНК негативно корелює з підвищенням рівня експресії відповідних мРНК (рис. 9).



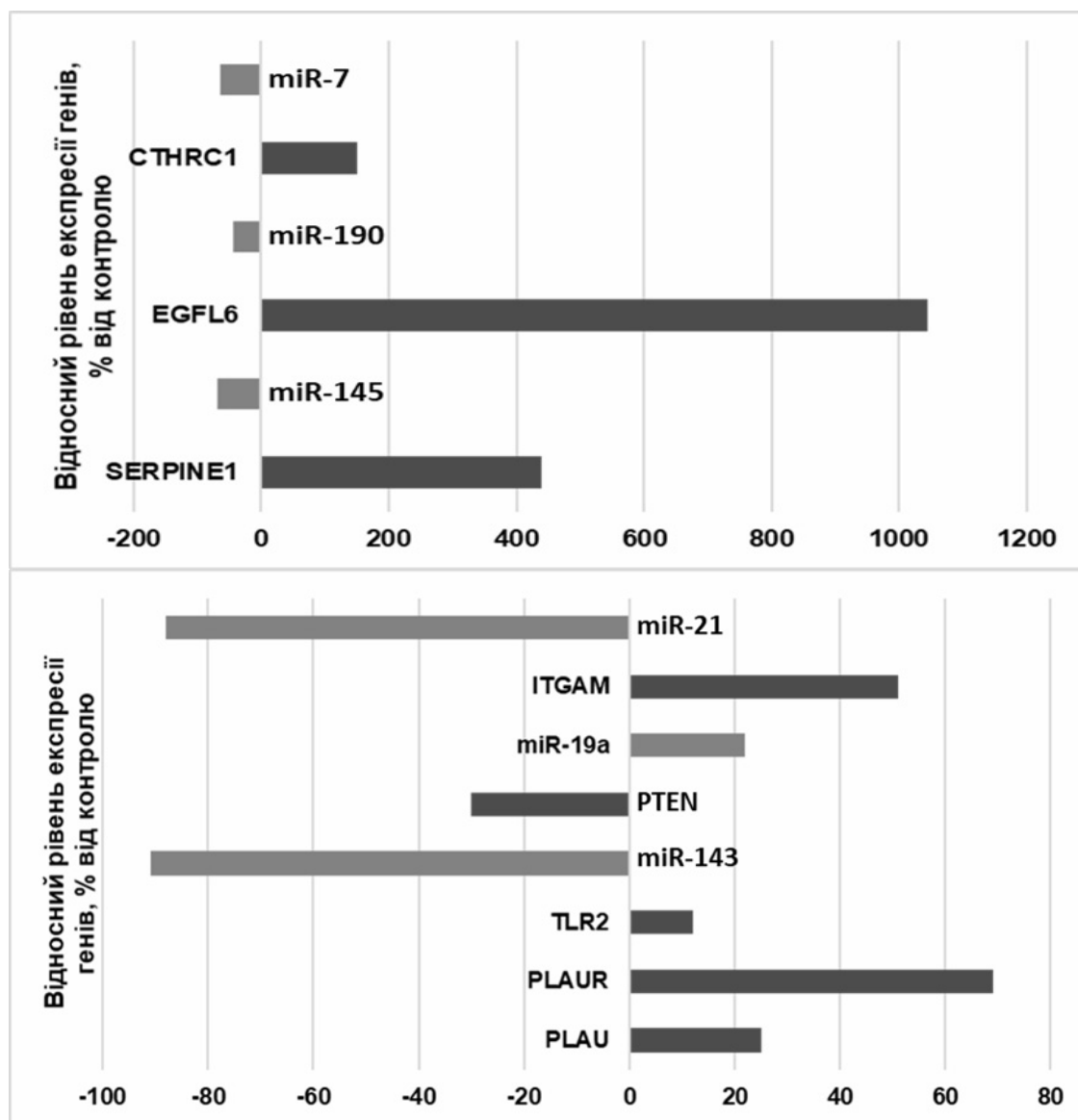


Рис. 9. Рівень експресії мікроРНК miR-19a, miR-21, miR-143, miR-145, miR-190 і miR-7 та відповідних мРНК, з 3'- послідовностями яких ці мікроРНК зв'язуються з високою специфічністю, у підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози.

Як видно із даних, приведених на рис. 8, miR-143 комплементарно зв'язується з 3'-UTR мРНК PLAUR, PLAUR та TLR2, що вказує на плейотропність мікроРНК [Баулина Н.М., 2016], причому знижений рівень експресії miR-143 (рис. 9) може бути причетним до підвищеної експресії PLAUR і його рецептора, а також TLR2. Відомо, що miR-143 відіграє важливу роль гена-супресора пухлин, може інгібувати експресію TLR2 та NF-κB і призводити до пригнічення проліферації і зниження міграції клітин [Liu X., 2015]. Підвищений рівень експресії miR-19a (рис.9) може призводити до зниження рівня мРНК PTEN, унаслідок чого підвищується активність АКТ та посилюється ріст злоякісних пухлин. Мішенню для miR-145 є ділянка мРНК регулятора фібринолітичної системи SERPINE1 (рис. 9). Ми показали, що рівень мікроРНК-145 зменшувався порівняно з контролем і що це може бути одним із факторів підвищеного рівня

експресії гена *SERPINE1* у підшкірній жировій тканині за умов ожиріння. Важливо відмітити, що мішенню miR-21 є мРНК *ITGAM*, який є рецептором для фібриногену і бере участь у згортанні крові.

Таким чином, отримані результати вказують на можливу роль досліджених мікроРНК, які з високою специфічністю зв'язуються з 3'- послідовностями відповідних мРНК, в регуляції експресії генів на пост-трансляційному рівні шляхом ініціації їх деградації.

### Узагальнююча схема

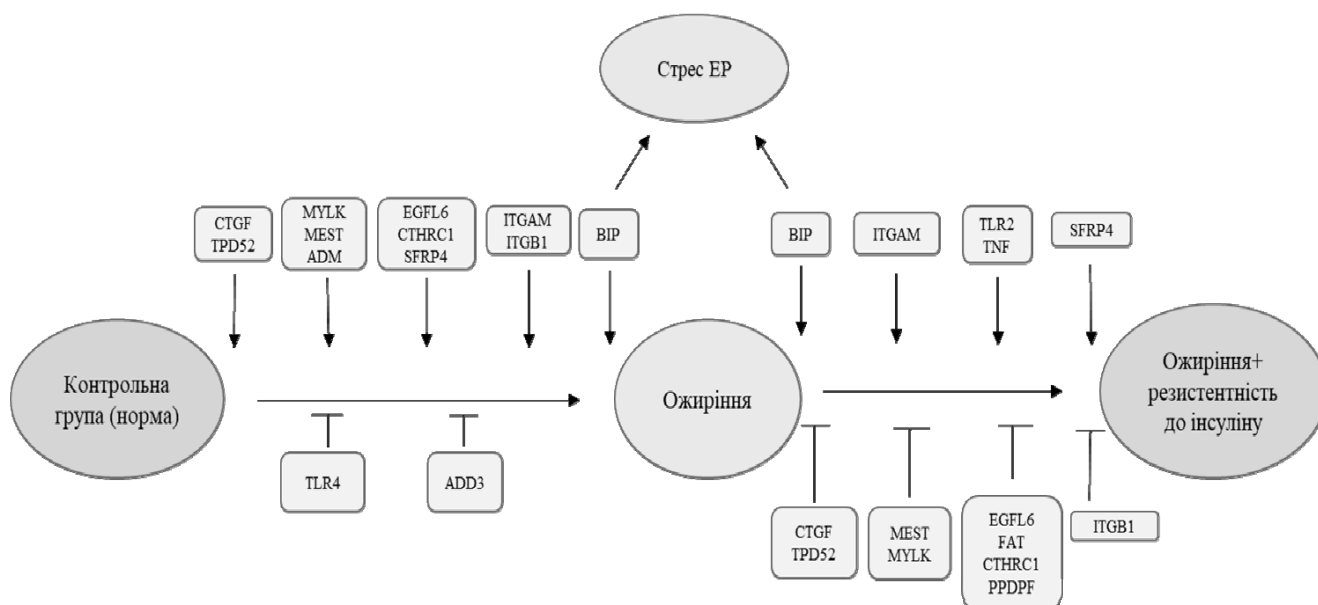


Рис. 10. Вплив ожиріння та резистентності до інсуліну за умов ожиріння на рівень експресії генів, які кодують ключові фактори регуляції різних метаболічних процесів, у підшкірній жировій тканині дорослих чоловіків. Вертикальними стрілочками позначено вплив підвищеного рівня експресії генів на розвиток як ожиріння, так і резистентності до інсуліну, а Т-подібними лініями – вплив зниженого рівня експресії генів на ці процеси.

### ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлено теоретично узагальнене 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* та *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* і *E2F8* і зниження – *PLAT*, *FGF1* та *FGFR2*, а це вказує на порушення процесів проліферації і 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 ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ 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 (*Особистий внесок здобувача – приймала участь у вивченні експресії генів, аналізі даних та оформленні статті*).

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 (*Особистий внесок здобувача – приймала участь у вивченні експресії генів*).

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 (*Особистий внесок здобувача – проводила дослідження по вивченню експресії генів та приймала участь в оформленні статті*).

4. 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

(Особистий внесок здобувача – вивчала експресію гена *CLEC3B* і підготувала матеріал до друку).

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 (Особистий внесок здобувача – приймала участь у вивченні експресії генів).

6. **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 (Особистий внесок здобувача – досліджувала експресію факторів проліферації та оформляла статтю).

7. **Bashta Y.M.**, Minchenko D.O., Vova 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 (Особистий внесок здобувача – дослідила експресію генів і написала статтю).

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. - P. 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. – Vol. 86. - N 5 (Suppl.1). - P. 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, 25-28 March 2014. – Kyiv. – P. 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, – С. 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, – С. 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.

## АНОТАЦІЯ

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

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 «Біохімія». – Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, 2019.

Робота присвячена дослідженню експресії генів, що кодують ключові фактори ангиогенезу, проліферації та протеїнфосфатази родини *DUSP*, у підшкірній жировій тканині чоловіків за умов ожиріння та резистентності до інсуліну, а також виявленню можливої кореляції між змінами індексу маси тіла (BMI) та рівня експресії цих генів.

Вперше було встановлено, що за умов ожиріння у підшкірній жировій тканині чоловіків пригнічується експресія генів основних факторів ангиогенезу (*VEGF-A*, *VEGF-A-189*, *FGF2* та *FGFRL1*), але збільшується рівень експресії генів *FGF1*, *FGFR2*, *CTGF*, *E2F8*, *HIF1A*, *PLAT*, *PLAU*, *PLAUR*, *SERPINE1* 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*, *HSPA5/BiP* 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*. За умов ожиріння знижується також рівень мікроРНК miR-21, miR-143, miR-145, miR-190 та miR-7, які мають сайти зв'язування в 3'-ділянках мРНК *SERPINE1*, *EGFL6*, *ITGAM*, *PLAU*, *PLAUR*, *TLR2* та *CTHRC1*, рівень експресії яких збільшується, що вказує на участь пост-транскрипційних механізмів регуляції експресії генів. Отримані 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.

## ANNOTATION

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

The thesis for PhD degree by speciality 03.00.04 – Biochemistry. – Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv Taras Shevchenko National University, Kyiv, 2019.

The thesis highlights investigation of the expression of genes upon encoded key factors of angiogenesis and proliferation as well as protein phosphatases of DUSP family in subcutaneous adipose tissue in obesity and insulin resistance as well as identification of possible correlation between changes in body mass index (BMI) and the expression level of these genes.

It was shown that in subcutaneous adipose tissue in adult obese men the expression of key genes encoded angiogenesis factors (VEGF-A, VEGF-A-189, FGF-2 and FGFR1) is decreased, but the expression level of *FGF1*, *FGFR2*, *CTGF*, *E2F8*, *HIF1A*, *PLAT*, *PLAU*, *PLAUR*, *SERPINE1* and *CLEC3B* genes is increased. Glucose intolerance in obesity is associated with increased level of *VEGF-A*, *FGF2*, *FGF1*, *E2F8*, *PLAU*, *PLAUR* and *SERPINE1* gene expressions and down-regulated expression level of *CLEC3B* gene in subcutaneous adipose tissue of adult obese men as compared to obese patients with normal glucose tolerance.

It has been established that the expression level of protein phosphatase *DUSP1*, *DUSP4*, *DUSP6* and *DUSP22* genes as well as *PTEN*, *TLR4* and *ADD3* in subcutaneous adipose tissue of adult obese men with normal glucose tolerance is decreased as compared to control group, but development of insulin resistance leads to up-regulation of protein phosphatase gene expressions. It was also shown that the expression level of *FAT1*, *PPDPF*, *CTGF*, *MEST*, *MYLK*, *TPD52*, *ITGB1*, *ITGAM*, *CTHRC1*, *SFRP4*, *EGFL6*, *TLR2*, *TNF*, *HSPA5/BiP* and *ADM* genes is increased in subcutaneous adipose tissue of adult obese men. Furthermore, development of insulin resistance in obese men leads to down-regulation of *CTGF*, *MYLK*, *TPD52*, *ITGB1*, *CTHRC1*, *EGFL6* and *ADM* genes, but up-regulation of *TNF* and *SFRP4* genes. Moreover, the increased level of mRNA *SERPINE1*, *EGFL6*, *ITGAM*, *PLAU*, *PLAUR*, *TLR2* and *CTHRC1* in subcutaneous adipose tissue of adult obese men is correlated with the decreased level of microRNA miR-21, miR-143, miR-145, miR-190 and miR-7, which have binding sites for these mRNA in their 3'-untranslated regions and can post-transcriptionally regulate gene expressions. Results of this investigation clearly demonstrated an important role of the expression level changes of key regulatory genes in obesity and its metabolic complications through genome reprogramming.

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