

УДК 577.112.7

Ю. Вілецька, асп.
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,
Д. Мінченко, канд. мед. наук, доц.
Національний медичний університет ім. О. О. Богомольця, Київ, Україна,
Інститут біохімії імені О. В. Палладіна, Київ, Україна,
В. Давидов, д-р біол. наук, проф.
ДЗ "Інститут охорони здоров'я дітей та підлітків НАМН України", Харків, Україна,
О. Мінченко, д-р біол. наук, проф.
Інститут біохімії імені О. В. Палладіна, Київ, Україна

РІВЕНЬ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНІВ *ADM*, *SLC1A3*, *HSPA5* ТА *PDGFC* У ПІДЛІТКІВ І ДОРОСЛИХ ЧОЛОВІКІВ З ОЖИРІННЯМ

Проаналізовано відносний рівень експресії генів *ADM* (адреномедуліну), *SLC1A3* (високоафінного переносника глутамату глії), *HSPA5* (протеїну теплового шоку A5) та *PDGFC* (тромбоцитарного фактора росту C), що кодують поліфункціональні протеїни, у крові підлітків і жировій тканині дорослих чоловіків з ожирінням за умов відсутності резистентності до інсуліну для визначення їх можливої ролі в розвитку ожиріння і його ускладнень. Установлено, що відносний рівень експресії генів *SLC1A3*, *HSPA5* та *PDGFC* у крові підлітків значно більший за умов ожиріння та відсутності резистентності до інсуліну порівняно з контрольною групою відносно здорових індивідуумів такого самого віку без ознак ожиріння. Проте у крові підлітків з ожирінням істотно не змінювався рівень експресії гена *ADM*. Показано також, що в підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням без ознак резистентності до інсуліну відносний рівень експресії генів *SLC1A3* та *PDGFC* був нижчим, а генів *ADM* та *HSPA5* – більшим порівняно з контрольною групою. Збільшення в підшкірній жировій тканині рівня експресії гена *ADM*, який має гіпотензивну активність, контролює секрецію кортикотропіну, лептину, ендотеліну-1 і адипонектину та є причетним до розвитку резистентності до інсуліну й метаболічного синдрому, а також посилено експресується в злоякісних пухлинах, може мати відношення до розвитку ускладнень ожиріння, у тому числі й до утворення злоякісних пухлин. Значною мірою це стосується і підвищеної експресії гена *HSPA5*, який задіяний у контролі різних метаболічних шляхів, причому як у клітинах, так і поза ними, виявляється в ендоплазматичному ретикулумі, ядрі, мітохондріях і цитозолі, відіграє важливу роль у стресі ендоплазматичного ретикулума, ожирінні, резистентності до інсуліну та канцерогенезі. Отже, рівень експресії генів, які причетні до розвитку ожиріння та стресу ендоплазматичного ретикулума, а також до регуляції процесів проліферації, змінювався в крові та жировій тканині за умов ожиріння гено-специфічно.

Ключові слова: експресія генів, *ADM*, *SLC1A3*, *HSPA5*, *PDGFC*, кров, жирова тканина, ожиріння.

Вступ. Ожиріння з його метаболічними ускладненнями, зокрема резистентністю до інсуліну, є одною з найважливіших проблем сьогодення в усьому світі. Розвиток ожиріння супроводжується численними порушеннями метаболічних процесів у всьому організмі, у тому числі й у жировій тканині, причому ці порушення значною мірою виявляються й у крові [1–3]. На молекулярному та клітинному рівнях були проведені дослідження, які чітко продемонстрували наявність взаємозв'язків між метаболічними порушеннями при ожирінні і його ускладненнями та дисрегуляцією ключових регуляторних механізмів шляхом змін в експресії великої кількості генів [2, 4, 5]. Ожиріння та його метаболічні ускладнення, як і багато інших захворювань, є результатом тісної взаємодії певних генетичних факторів і різноманітних зовнішніх чинників, хоча дисрегуляція метаболізму, у свою чергу, може призводити до певних змін у функціонуванні регуляторних механізмів клітин на різних рівнях [6, 7]. Відомо, що адіпогенез, як і процеси транспорту та метаболізму глюкози і ліпідів, а також багато інших, включаючи процеси проліферації, контролюються сіткою регуляторних факторів, що тісно пов'язані між собою [6, 7]. Раніше було показано, що за умов ожиріння без порушення толерантності до інсуліну в клітинах крові підлітків посилюється експресія генів *IRS1*, *CCN2*, *IGSEC*, *RSP01*, *IL13RA2* та *RIPK2*, знижується рівень експресії генів *IRS2* і *DNAJC15*, а з резистентністю до інсуліну за умов ожиріння асоціюється лише зміни рівня експресії генів *IRS1*, *IRS2*, *DNAJC15*, *RSP01* та *RIPK2* [8].

Відомо, що ріст жирової тканини викликає локальне хронічне запалення та порушує функцію адипоцитокінів, які причетні до розвитку метаболічного синдрому, а це може призводити до порушення експресії генів у клітинах крові [3, 7]. У зв'язку з цим пізнання детальних молекулярних механізмів порушення процесів метаболізму на клітинному та системному рівнях буде сприяти виявленню як природи ожиріння, так і його метаболіч-

них ускладнень, а також розробці нових стратегій профілактики та лікування цих захворювань.

Численні дані вказують на те, що ключові регуляторні ензими, рецептори та фактори, у тому числі й такі, як *ADM* (adrenomedullin), *SLC1A3* (solute carrier family 1, member 3: glial high affinity glutamate transporter), *PDGFC* (platelet derived growth factor C) та *HSPA5* (Heat Shock Protein Family A Member 5), є поліфункціональними, залежними від стресу ендоплазматичного ретикулума протеїнами і контролюють різні метаболічні шляхи, причому цілу низку функцій виконують як у клітинах, так і поза ними, є причетними до канцерогенезу [2, 6, 7, 9, 10, 14–16]. Наприклад, *ADM* має гіпотензивну активність, контролює секрецію кортикотропіну, лептину, ендотеліну-1 та адипонектину, причетний до розвитку резистентності до інсуліну та метаболічного синдрому, посилено експресується в злоякісних пухлинах і активує метастазування [9–13]. Більше того, лептин, ендотеліну-1 і адипонектин також впливають на рівень *ADM* [13]. Відомо, що лептин є важливим регулятором не лише росту жирової тканини, він контролює різні аспекти метаболізму, задіяний у різноманітних сигнальних шляхах, у тому числі в регуляції процесів проліферації. Високоафінний переносник глутамату глії (*SLC1A3*), відомий ще як *EAAT1* (excitatory amino acid transporters 1), контролює перенесення не лише глутамату, а й аспартату, причетний до перенесення глюкози та інших цукрів, органічних кислот, іонів металів і деяких аміних сполук, залежить від стресу ендоплазматичного ретикулума і задіяний у регуляції пухлинних клітин [14]. *PDGFC*, відомий ще як *VEGFE* (vascular endothelial growth factor E), бере участь у регуляції процесів проліферації, ангиогенезу та міграції клітин, виживання клітин і апоптозу, зокрема шляхом посилення фосфорилування протеїнів Akt та Bad, а також має деякі інші функції [15].

Протеїн теплового шоку A5 (*HSPA5*) є шапероном, який відомий ще як 78 kDa протеїн, що регулюється глюкозою (*GRP78*), а також як протеїн *grp78*, який зв'я-

зується з іонами кальцію в ендоплазматичному ретикулумі та BiP (протеїн, що зв'язується з тяжким ланцюжком імуноглобуліну). Він є поліфункціональним протеїном, задіяний у контролі різних метаболічних шляхів, причому як у клітинах, так і поза ними, виявляється в ендоплазматичному ретикулумі, ядрі, мітохондріях і цитозолі, відіграє важливу роль у стресі ендоплазматичного ретикулума, ожирінні, резистентності до інсуліну та канцерогенезі, а його пригнічення блокує ріст злоякісних пухлин [16–18]. Відомо, що активність сенсорно-сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулума IRE1 селективно пригнічується шапероном HSPA5/BiP у комплексі з ко-шапероном ERdj4/DNAJB9 у люмені ендоплазматичного ретикулума і що за умов стресу протеїн HSPA5 посилює проліферацію клітин і антиапоптоз [16–18]. Таким чином, усі ці гени мають певне значення в розвитку ожиріння, резистентності до інсуліну, а також у канцерогенезі. Дослідження, проведені на нокаутних за геном SNARK мишах, показали, що розвиток ожиріння і метаболічного синдрому в таких тварин асоціюється зі схильністю до утворення злоякісних пухлин [19].

Важливо зазначити, що характерною особливістю як ожиріння, так і асоційованої з ним резистентності до інсуліну, а також деяких інших патологічних станів, є стрес ендоплазматичного ретикулума [6, 7]. Цей стрес є вагомим чинником індукції метаболічного синдрому при ожирінні, оскільки при цьому істотно порушуються сигнальні шляхи від рецептора інсуліну за рахунок змін в експресії великої кількості генів [7, 8]. Разом з тим, детальні молекулярні механізми участі різних генів у розвитку ожиріння і його ускладнень ще не зовсім з'ясовані та заслуговують на подальше детальне вивчення.

Метою роботи було проаналізувати відносний рівень експресії генів *ADM*, *SLC1A3*, *HSPA5* та *PDGFC* у крові підлітків і жировій тканині дорослих чоловіків з ожирінням за умов відсутності резистентності до інсуліну для визначення можливої їх ролі в розвитку ожиріння.

Матеріали та методи. Дослідження проводили на підлітках чоловічої статі віком біля 14 років, які були розділені на дві групи (по сім у кожній групі). Перша, контрольна, група включала практично здорових дітей без ознак ожиріння з індексом маси тіла (ІМТ) $18,7 \pm 0,12 \text{ кг/м}^2$ (табл. 1).

Таблиця 1. Клінічна характеристика досліджених груп підлітків з ожирінням без резистентності до інсуліну порівняно з контрольною групою

	Контроль	Ожиріння – PI
Вік на час обстеження (роки)	$14,2 \pm 0,584$	$13,8 \pm 0,265$
Індекс маси тіла (ІМТ), кг/м^2	$18,8 \pm 0,17$	$31,1 \pm 0,36^*$
Індекс резистентності до інсуліну (НОМА)	$2,38 \pm 0,128$	$2,63 \pm 0,219$
Інсулін натщесерце (МО/мл)	$12,8 \pm 0,69$	$14,3 \pm 0,95$
Глюкоза натщесерце (ммоль/л)	$4,07 \pm 0,177$	$4,3 \pm 0,183$
2 год пероральний глюкозотолерантний тест (ммоль/л)	$4,19 \pm 0,124$	$4,74 \pm 0,215$

Примітка: наведено середні дані $\pm m$; МО – міжнародні одиниці; $n = 7$;

* – $p \leq 0,05$ порівняно з контрольною групою (контроль)

До другої групи були відібрані підлітки, що мали ожиріння без резистентності до інсуліну, а ІМТ дорівнював $31,0 \pm 0,40 \text{ кг/м}^2$. Обстеження пацієнтів і отримання біологічного матеріалу було проведено в ДЗ "Інститут охорони здоров'я дітей та підлітків НАМН України" з дотриманням усіх біотичних вимог. Установлено, що індекс маси тіла був значно більшим у групі дітей з ожирінням ($+66\%$; $p \leq 0,05$) порівняно з контрольною групою (табл. 1). Подібні результати були отримані й при дослідженні рівня інсуліну в крові натщесерце: відсутність істотних змін у дітей з ожирінням без ознак резистентності до інсуліну порівняно з контрольною групою (табл. 1). Були проведені також дослідження на жировій тканині, яку брали шляхом біопсії в дорослих чоловіків віком біля 45 років, розділених також на дві групи (по шість у кожній): контрольні (без ознак ожиріння та ІМТ $23 \pm 1,4 \text{ кг/м}^2$) і з ожирінням (ІМТ $32 \pm 1,4 \text{ кг/м}^2$). Обстеження пацієнтів і отримання біологічного матеріалу було проведено в Інституті експериментальної ендокринології Словацької академії наук з дотриманням усіх біотичних вимог під керівництвом директора інституту, проф. І. Klimes. Клінічна характеристика пацієнтів, отримання й аналіз РНК були описані раніше [1].

Із крові підлітків виділяли РНК за допомогою реагенту Trisol (Invitrogen, США), як було описано раніше [20]. Осади РНК промивали 75 %-м етанолом, розчиняли у воді, вільній від рибонуклеаз, переосадували етано-

лом для додаткового очищення від можливих залишків фенолу, знову розчиняли у воді й використовували для синтезу комплементарної ДНК. Концентрацію та спектральні характеристики отриманих препаратів РНК визначали на безжоветному спектрофотометрі "NanoDrop Spectrophotometer ND1000" ("PEQLAB", Німеччина). Для синтезу комплементарної ДНК (кДНК) використовували тотальну РНК із крові як матрицю та набір "QuantiTect Reverse Transcription Kit" (QIAGEN, Німеччина) згідно з протоколом виробника, у якому передбачено етап, що забезпечує елімінацію можливих залишків геномної ДНК. Рівень експресії генів *ADM*, *SLC1A3*, *PDGFC* та *HSPA5* у крові та жировій тканині визначали методом кількісної полімеразної реакції в реальному часі, використовуючи "QuantStudio 5 Real-Time PCR System" (Applied Biosystems, США) та "SYBRGreen Mix" ("AB gene", "Thermo Fisher Scientific", Epsom, Surrey, UK). Ампліфікацію проводили протягом 40 циклів для всіх досліджених генів за таких температурних умов циклу: $95^\circ\text{C} - 20 \text{ с}$, $55^\circ\text{C} - 20 \text{ с}$ та $72^\circ\text{C} - 20 \text{ с}$. Нуклеотидні послідовності праймерів, що використовували для ампліфікації фрагментів кДНК мРНК *ADM*, *SLC1A3*, *PDGFC* та *HSPA5*, а також положення в мРНК і довжина продуктів ампліфікації кількісної полімеразної ланцюгової реакції наведені в табл. 2.

Таблиця 2. Олігонуклеотидні праймери, що використовувались для визначення рівня експресії мРНК досліджених генів методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції комплементарних ДНК

Символ гена	Назва гена	Послідовності праймерів	Положення праймера в мРНК	Номер мРНК у базі GenBank
<i>ADM</i>	adrenomedullin	П: 5'- agtgggacgtctgagacttt З: 5'- cacgactcagagcccactta	80–99 280–271	NM_001124
<i>SLC1A3</i>	solute carrier family 1 member 3 (Glial High Affinity Glutamate Transporter)	П: 5'- ccattcccactctctcttt З: 5'- ccacagaaagccaacacctcc	175–194 423–404	NM_004172
<i>PDGFC</i>	platelet derived growth factor C	П: 5'- ctcttggttaaacgctgtgg З: 5'- tatctctctgtctcctct	1314–1333 1528–1509	NM_016205
<i>HSPA5 (GRP78; BiP)</i>	Heat Shock Protein Family A (Hsp70) Member 5 (78 kDa glucose-regulated protein; immunoglobulin heavy chain-binding protein)	П: 5'- gctggcaagatgaagctctc З: 5'- atcagacgtccccctcagg	253–272 488–469	NM_005347
<i>ACTB</i>	beta-actin	П: 5'- ggactctcgagcaagatgg З: 5'- agcactgtgtggcgtacag	747–766 980–961	NM_001101

Примітка: П – прямий, З – зворотний праймер

Дизайн і селекцію праймерів проводили в програмі "Primer3 web", версія 4.0.0 (<http://primer3.ut.ee/>). За рівнем експресії гена бета-актину оцінювали рівень експресії мРНК досліджуваних генів. Олігонуклеотидні праймери були отримані з компанії "Sigma-Aldrich" (США). Аналіз результатів дослідження експресії генів *ADM*, *SLC1A3*, *PDGFC* та *HSPA5* виконували за допомогою спеціалізованого програмного забезпечення – програми "Differential expression calculator", статистичний аналіз проводили з використанням *t*-критерію однієї проби (one sample *t* test) або *t*-критерію для двох незалежних вибірок. Отримані дані мали нормальне розподілення. Значення експресії генів *ADM*, *SLC1A3*, *PDGFC* та *HSPA5* нормалізували за рівнем експресії гена бета-актину і представляли у відсотках від контролю (100 %). Представлені середні значення $\pm m$ семи експериментів для крові та шести – для жирової тканини для кожного з досліджених генів у трьох повторах.

Результати дослідження та їх обговорення. Як видно з даних, наведених у табл. 3, відносний рівень експресії гена *ADM* у крові підлітків з ожирінням, але без ознак резистентності до інсуліну, істотно не змінюється порівняно з контрольною групою. Дещо інші зміни були виявлені при дослідженні рівня експресії генів *SLC1A3* та *PDGFC* (табл. 3). Так, рівень експресії генів *SLC1A3* та *PDGFC* у крові підлітків з ожирінням, що не мали ознак резистентності до інсуліну, збільшується на 21 % та 12 %, відповідно ($p \leq 0,05$ в обох випадках), порівняно з контрольною групою. Крім того, результати дослідження відносного рівня експресії гена *HSPA5/BiP* у крові підлітків продемонстрували, що рівень експресії цього гена значно більший за умов ожиріння без ознак резистентності до інсуліну (+71 %; $p \leq 0,01$) порівняно з контрольною групою (табл. 3).

Таблиця 3. Відносний рівень експресії генів *ADM*, *SLC1A3*, *HSPA5* та *PDGFC* у крові підлітків з ожирінням без резистентності до інсуліну

№ п/п	Ген	Контрольна група підлітків	Ожиріння без ознак резистентності до інсуліну
1	<i>ADM</i>	100	98 \pm 5,21 $p > 0,5$
2	<i>SLC1A3</i>	100	121 \pm 4,50 $p \leq 0,05$
3	<i>PDGFC</i>	100	112 \pm 3,85 $p \leq 0,05$
4	<i>HSPA5</i>	100	171 \pm 5,09 $p \leq 0,001$

Примітка. Відносний рівень експресії мРНК *ADM*, *SLC1A3*, *HSPA5* та *PDGFC* за умов ожиріння без ознак резистентності до інсуліну нормалізували за рівнем експресії гена бета-актину і представляли у відсотках від контролю (контрольна група підлітків без ознак ожиріння), прийнятого за 100 %; $n = 7$; p – значення "р" при порівнянні з контролем

Результати цих досліджень свідчать про те, що за умов ожиріння без ознак резистентності до інсуліну змінюється відносний рівень експресії генів *SLC1A3*, *PDGFC* та *HSPA5* у крові підлітків порівняно з контрольною групою і що ці гени причетні до певних метаболічних порушень при ожирінні. Значне підвищення рівня експресії гена *HSPA5* у крові підлітків з ожирінням без ознак резистентності до інсуліну вказує на наявність стресу ендоплазматичного ретикулума, оскільки *HSPA5* є стрес-залежним шапероном BiP. Цей шаперон причетний до формування третинної структури протеїнів, рівень його експресії підвищується за умов індукції стресу ендоплазматичного ретикулума. Відомо, що BiP значною мірою контролює активність сенсорно-

сигнальних шляхів цього стресу і причетний до розвитку метаболічного синдрому [16].

Були також проведені дослідження відносного рівня експресії генів *ADM*, *SLC1A3*, *HSPA5* та *PDGFC* у підшкірній жировій тканині дорослих чоловіків з ожирінням без ознак резистентності до інсуліну, результати яких представлені в табл. 4. Установлено, що в підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням рівень експресії генів *SLC1A3* та *PDGFC* знижується на 14 та 18 %, відповідно ($p \leq 0,05$ для обох генів), порівняно з контрольною групою. Проте відносний рівень експресії генів *ADM* та *HSPA5*, навпаки, різко збільшується: на 72 та +55 %, відповідно ($p \leq 0,01$ в обох випадках), у групі чоловіків з ожирінням порівняно з контрольною групою (табл. 4).

Таблиця 4. Відносний рівень експресії генів *ADM*, *SLC1A3*, *HSPA5* та *PDGFC* у підшкірній жировій тканині дорослих чоловіків з ожирінням без ознак резистентності до інсуліну за даними кількісної полімеразної ланцюгової реакції

№ п/п	Ген	Контрольна група чоловіків	Ожиріння без ознак резистентності до інсуліну
1	<i>ADM</i>	100	172 ± 8,13 p ≤ 0,01
2	<i>SLC1A3</i>	100	86 ± 4,11 p ≤ 0,05
3	<i>PDGFC</i>	100	82 ± 3,92 p ≤ 0,05
4	<i>HSPA5</i>	100	155 ± 6,12 p ≤ 0,01

Примітка. Відносний рівень експресії мРНК *ADM*, *SLC1A3*, *HSPA5* та *PDGFC* у підшкірній жировій тканині дорослих чоловіків з ожирінням без ознак резистентності до інсуліну нормалізували за рівнем експресії гена бета-актину і представляли у відсотках від контролю, прийнятого за 100 %; n = 6; p – значення "р" при порівнянні з контролем

Результати дослідження відносного рівня експресії генів *ADM*, *SLC1A3*, *HSPA5* та *PDGFC* у підшкірній жировій тканині дорослих чоловіків із ожирінням без ознак резистентності до інсуліну свідчать про те, що експресія досліджених генів у підшкірній жировій тканині істотно змінюється за умов ожиріння й указує на їх можливу участь у розвитку ожиріння та пов'язаних із ним метаболічних ускладнень.

Отже, результати цієї роботи розкривають нові аспекти молекулярних механізмів розвитку ожиріння, вони свідчать про участь генів *ADM*, *SLC1A3*, *HSPA5* та *PDGFC* у розвитку цього патологічного стану. Показано, що зміни в експресії цих генів за умов ожиріння мають гено-специфічний і тканинно-специфічний характер. Значне підвищення рівня експресії гена *HSPA5* у крові підлітків і підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням указує на розвиток опосередкованого ожирінням стресу ендоплазматичного ретикула, оскільки *HSPA5* є шапероном, причетним до формування третинної структури протеїнів, і посилено експресується за умов індукції цього стресу, але він також причетний і до розвитку метаболічного синдрому. Відомо, що активність IRE1, основного сенсорно-сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикула, контролюється шапероном *HSPA5*/BiP і що за умов цього стресу *HSPA5* посилює проліферацію клітин і антиапоптоз, а його пригнічення блокує ріст злоякісних пухлин [16–18]. Отримані нами результати роблять певний внесок у розуміння молекулярних механізмів підвищеної схильності до канцерогенезу організмів з ожирінням, оскільки всі проаналізовані в цій роботі гени, а особливо гени *HSPA5* та *ADM*, задіяні не лише в розвитку ожиріння, а й контролюють ріст злоякісних пухлин [9–13, 15–18]. Усе це узгоджується з дослідженнями, проведеними японськими вченими на мишах, нокаутних за геном *SNARK* [19]. Вони показали, що розвиток ожиріння та метаболічного синдрому в таких тварин асоціюється зі схильністю до утворення злоякісних пухлин.

Висновки

1. Установлено, що в крові підлітків з ожирінням без ознак резистентності до інсуліну рівень експресії генів *SLC1A3*, *HSPA5* та *PDGFC* є підвищеним порівняно з контрольною групою.

2. Установлено, що в підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням рівень експресії генів *SLC1A3* та *PDGFC* знижується, а генів *ADM* та *HSPA5* – збільшується порівняно з контрольною групою.

3. Значне підвищення рівня експресії гена *HSPA5* у крові підлітків і підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням указує на наявність стресу ендоплазматич-

ного ретикула, оскільки *HSPA5* є стрес-залежним шапероном, причетним до формування третинної структури протеїнів, і посилено експресується за умов індукції цього стресу.

4. Результати цієї роботи вказують на можливу участь генів *ADM*, *SLC1A3*, *HSPA5* та *PDGFC* у розвитку ожиріння та його ускладнень.

Список використаної літератури:

1. Minchenko D. The expression of TIMP1, TIMP2, VCAN, SPARC, CLEC3B and E2F1 in subcutaneous adipose tissue of obese males and glucose intolerance / D. Minchenko, O. Ratushna, Y. Bashta // *CellBio.* – 2013. – Vol. 2, № 2. – P. 25–33.
2. Мінченко Д. О. Молекулярні основи розвитку ожиріння та його метаболічних ускладнень у дітей / Д. О. Мінченко // *Сучасна педіатрія.* – 2015. – № 2(66). – С. 109–112.
3. A pilot investigation of visceral fat adiposity and gene expression profile in peripheral blood cells / M. Yamaoka, N. Maeda, S. Nakamura et al. // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7, № 10. – P. e47377.
4. Impairment of peripheral circadian clocks precedes metabolic abnormalities in ob/ob mice / H. Ando, M. Kumazaki, Y. Motosugi et al. // *Endocrinology.* – 2011. – Vol. 152, № 4. – P. 1347–1354.
5. Adipose hypothermia in obesity and its association with period homolog 1, insulin sensitivity, and inflammation in fat / M. Yamaoka, N. Maeda, Y. Takayama et al. // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9, № 11. – P. e112813.
6. Endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: dynamics and metabolic integration / R. Bravo, V. Parra, D. Gatica et al. // *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.* – 2013. – Vol. 301. – P. 215–290.
7. Han J. Measurement of the unfolded protein response to investigate its role in adipogenesis and obesity / J. Han, R. J. Kaufman // *Methods Enzymol.* – 2014. – Vol. 538. – P. 135–150.
8. Expression of *CCN2*, *IQSEC*, *RSP01*, *DNAJC15*, *RIPK2*, *IL13RA2*, *IRS1*, and *IRS2* genes in blood cells of obese boys with and without insulin resistance / D. O. Minchenko, V. V. Davydov, O. A. Budreiko et al. // *Fiziol. Zh.* – 2015. – Vol. 61, № 1. – P. 10–18.
9. Adrenomedullin is up-regulated in patients with pancreatic cancer and causes insulin resistance in β cells and mice / G. Aggarwal, V. Ramachandran, N. Javeed et al. // *Gastroenterology.* – 2012. – Vol. 143, № 6. – P. 1510–1517.
10. Adrenomedullin promotes intrahepatic cholangiocellular carcinoma metastasis and invasion by inducing epithelial-mesenchymal transition / C. Zhou, Y. Zheng, L. Li et al. // *Oncol. Rep.* – 2015. – Vol. 34, № 2. – P. 610–616.
11. Adrenomedullin 2 Improves Early Obesity-Induced Adipose Insulin Resistance by Inhibiting the Class II MHC in Adipocytes / S. Y. Zhang, Y. Lv, H. Zhang et al. // *Diabetes.* – 2016. – Vol. 65, № 8. – P. 2342–2355.
12. Effects of adrenomedullin on tumour necrosis factor alpha, interleukins, endothelin-1, leptin, and adiponectin in the epididymal fat and soleus muscle of the rat / S. B. Liao, P. F. Wong, B. M. Cheung et al. // *Horm. Metab. Res.* – 2013. – Vol. 45, № 1. – P. 31–37.
13. Adrenomedullin in the growth modulation and differentiation of acute myeloid leukemia cells / R. Di Liddo, D. Bridi, M. Gottardi et al. // *Int. J. Oncol.* – 2016. – Vol. 48, № 4. – P. 1659–1669.
14. A new splice variant of the glutamate-aspartate transporter: cloning and immunolocalization of GLAST1c in rat, pig and human brains / A. Lee, A. R. Anderson, S. J. Beasley et al. // *J. Chem. Neuroanat.* – 2012. – Vol. 43, № 1. – P. 52–63.
15. Platelet-derived growth factor-C (PDGF-C) induces anti-apoptotic effects on macrophages through Akt and Bad phosphorylation / D. Son, Y. R. Na, E. S. Hwang et al. // *J. Biol. Chem.* – 2014. – Vol. 289, № 9. – P. 6225–6235.

16. A J-Protein Co-chaperone Recruits BiP to Monomerize IRE1 and Repress the Unfolded Protein Response / N. Amin-Wetzel, R. A. Saunders, M. J. Kamphuis et al. // *Cell*. – 2017. – Vol. 171, № 7. – P. 1625–1637.

17. MicroRNA-30a-5p Inhibits the Growth of Renal Cell Carcinoma by Modulating GRP78 Expression / C. Wang, L. Cai, J. Liu et al. // *Cell. Physiol. Biochem*. – 2017. – Vol. 43, № 6. – P. 2405–2419.

18. KIAA1324 Suppresses Gastric Cancer Progression by Inhibiting the Oncoprotein GRP78 / J. M. Kang, S. Park, S. J. Kim et al. // *Cancer Res*. – 2015. – Vol. 75, № 15. – P. 3087–3097.

19. Susceptibility of Snark-deficient mice to azoxymethane-induced colorectal tumorigenesis and the formation of aberrant crypt foci / K. Tsuchihara, T. Ogura, R. Fujioka et al. // *Cancer Sci*. – 2008. – Vol. 99, № 4. – P. 677–682.

20. Hypoxic regulation of *MYBL1*, *MEST*, *TCF3*, *TCF8*, *GTF2B*, *GTF2F2* and *SNAI2* genes expression in U87 glioma cells upon IRE1 inhibition / O. H. Minchenko, D. O. Tsybmal, D. O. Minchenko, O. O. Kubaichuk // *Ukr Biochem J*. – 2016. – Vol. 88, № 6. – P. 52–62.

References

1. Minchenko D, Ratushna O, 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; Vol. 2(2):25–33.

2. Minchenko DO. Molecular bases of the development of obesity and its metabolic complications in children. *Modern Pediatrics* 2013;2(66):25–33.

3. Yamaoka M, Maeda N, Nakamura S, Kashine S, Nakaigawa Y, Hiuge-Shimizu A, et al. A pilot investigation of visceral fat adiposity and gene expression profile in peripheral blood cells. // *PLoS One* 2012;7(10):e47377.

4. Ando H, Kumazaki M, Motosugi Y, Ushijima K, Maekawa T, Ishikawa E, et al. Impairment of peripheral circadian clocks precedes metabolic abnormalities in ob/ob mice. *Endocrinology* 2011;152(4):1347–54.

5. Yamaoka M, Maeda N, Takayama Y, Sekimoto R, Tsumura Y, Matsuda K, et al. Adipose hypothermia in obesity and its association with period homolog 1, insulin sensitivity, and inflammation in fat. *PLoS One* 2014;9(11):e112813.

6. Bravo R, Parra V, Gatica D, Rodriguez AE, Torrealba N, Paredes F, et al. Endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: dynamics and metabolic integration. *Int Rev Cell Mol Biol* 2013;301:215-90.

7. Han J, Kaufman RJ. Measurement of the unfolded protein response to investigate its role in adipogenesis and obesity. *Methods Enzymol* 2014;538:135-50.

8. Minchenko DO, Davydov VV, Budreiko OA, Moliavko OS, Kulieshova DK, Tiazhka OV, et al. Expression of *CCN2*, *IQSEC*, *RSP01*, *DNAJC15*, *RIPK2*, *IL13RA2*, *IRS1*, and *IRS2* genes in blood cells of obese boys with and without insulin resistance. *Fiziol Zh*. 2015;61(1):10-8.

9. Aggarwal G, Ramachandran V, Javeed N, Arumugam T, Dutta S, Klee GG, et al. Adrenomedullin is up-regulated in patients with pancreatic cancer and causes insulin resistance in β cells and mice. *Gastroenterology* 2012;143(6):1510-1517.

10. Zhou C, Zheng Y, Li L, Zhai W, Li R, Liang Z, et al. Adrenomedullin promotes intrahepatic cholangiocellular carcinoma metastasis and invasion by inducing epithelial-mesenchymal transition. *Oncol. Rep* 2015;34(2):610-6.

11. Zhang SY, Lv Y, Zhang H, Gao S, Wang T, Feng J, et al. Adrenomedullin 2 Improves Early Obesity-Induced Adipose Insulin Resistance by Inhibiting the Class II MHC in Adipocytes. *Diabetes* 2016;65(8):2342-55.

12. Liao SB, Wong PF, WSO, Cheung BM, Tang F. Effects of adrenomedullin on tumour necrosis factor alpha, interleukins, endothelin-1, leptin, and adiponectin in the epididymal fat and soleus muscle of the rat. *Horm Metab Res*. 2013 Jan;45(1):31-7.

13. Di Liddo R, Bridi D, Gottardi M, De Angeli S, Grandi C, Tasso A, et al. Adrenomedullin in the growth modulation and differentiation of acute myeloid leukemia cells. *Int J Oncol* 2016;48(4):1659-69.

14. Lee A, Anderson AR, Beasley SJ, Barnett NL, Poronnik P, Pow DV. A new splice variant of the glutamate-aspartate transporter: cloning and immunolocalization of GLAST1c in rat, pig and human brains. *J Chem Neuroanat* 2012;43(1):52-63.

15. Son D, Na YR, Hwang ES, Seok SH. Platelet-derived growth factor-C (PDGF-C) induces anti-apoptotic effects on macrophages through Akt and Bad phosphorylation. *J Biol Chem* 2014;289(9):6225-6235.

16. Amin-Wetzel N, Saunders RA, Kamphuis MJ, Rato C, Preissler S, Harding HP, et al. A J-Protein Co-chaperone Recruits BiP to Monomerize IRE1 and Repress the Unfolded Protein Response. *Cell* 2017;171(7):1625-37.

17. Wang C, Cai L, Liu J, Wang G, Li H, Wang X, et al. MicroRNA-30a-5p Inhibits the Growth of Renal Cell Carcinoma by Modulating GRP78 Expression. *Cell Physiol Biochem* 2017;43(6):2405-19.

18. Kang JM, Park S, Kim SJ, Kim H, Lee B, Kim J, et al. KIAA1324 Suppresses Gastric Cancer Progression by Inhibiting the Oncoprotein GRP78. *Cancer Res* 2015;75(15):3087-97.

19. Tsuchihara K, Ogura T, Fujioka R, Fujii S, Kuga W, Saito M, et al. Susceptibility of Snark-deficient mice to azoxymethane-induced colorectal tumorigenesis and the formation of aberrant crypt foci. // *Cancer Sci* 2008;99(4):677-82.

20. Minchenko OH, Tsybmal DO, Minchenko DO, Kubaichuk OO. Hypoxic regulation of *MYBL1*, *MEST*, *TCF3*, *TCF8*, *GTF2B*, *GTF2F2* and *SNAI2* genes expression in U87 glioma cells upon IRE1 inhibition. *Ukr Biochem J* 2016;88(6):52-62.

Надійшла до редакції 26.09.2018

Отримано виправлений варіант 29.10.2018

Підписано до друку 29.10.2018

Received in the editorial 26.09.2018

Received a revised version on 29.10.2018

Signed in the press on 29.10.2018

Ю. М. Вилецька, асп.

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,

Д. О. Минченко, канд. мед. наук, доц.,

Національний медичний університет ім. А. А. Богомольця, Київ, Україна,

Інститут біохімії імені А.В. Палладина, Київ, Україна,

В. В. Давыдов, д-р біол. наук, проф.

ГУ "Інститут охорони здоров'я дітей і підлітків НАМН України", Харків, Україна,

О. Г. Минченко, д-р біол. наук, проф.

Інститут біохімії імені А. В. Палладина, Київ, Україна

УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *ADM*, *SLC1A3*, *HSPA5* И *PDGFC* У ПОДРОСТКОВ И ВЗРОСЛЫХ МУЖЧИН С ОЖИРЕНИЕМ

Проанализирован относительный уровень экспрессии генов *ADM* (адреномедулина), *SLC1A3* (высокоаффинного переносчика глутамата глици), *HSPA5* (протеина теплового шока A5) и *PDGFC* (тромбоцитарного фактора роста C), которые кодируют полифункциональные протеины, в крови подростков и жировой ткани взрослых мужчин с ожирением при отсутствии резистентности к инсулину для определения возможной их роли в развитии ожирения и его осложнений. Установлено, что относительный уровень экспрессии генов *SLC1A3*, *HSPA5* и *PDGFC* в крови подростков при ожирении без признаков резистентности к инсулину был выше по сравнению с контрольной группой относительно здоровых индивидуумов такого же возраста без признаков ожирения. Однако в крови подростков с ожирением относительный уровень экспрессии гена *ADM* существенно не изменялся. Показано также, что в подкожной жировой ткани мужчин с ожирением без признаков резистентности к инсулину относительный уровень экспрессии генов *SLC1A3* и *PDGFC* был ниже, а генов *ADM* и *HSPA5* – выше по сравнению с контрольной группой. Увеличение в подкожной жировой ткани уровня экспрессии гена *ADM*, который имеет гипотензивную активность, контролирует секрецию кортикотропина, лептина, эндотелина-1 и адипонектина и участвует в развитии резистентности к инсулину, а также усиленно экспрессируется в злокачественных опухолях, может иметь отношение к развитию осложненного ожирения, в том числе и образованию злокачественных опухолей. В основном это относится к увеличенной экспрессии гена *HSPA5*, который контролирует различные метаболические пути в клетках и вне их, обнаруживается в эндоплазматическом ретикулуме, ядре, митохондриях и цитозоле, играет важную роль в развитии стресса эндоплазматического ретикулума, ожирения, резистентности к инсулину и канцерогенезе. Таким образом, уровень экспрессии генов, которые причастны к развитию ожирения и стрессу эндоплазматического ретикулума, а также регуляции процессов пролиферации, изменялся в крови и жировой ткани при ожирении гено-специфически.

Ключевые слова: экспрессия генов, *ADM*, *SLC1A3*, *HSPA5*, *PDGFC*, кровь, жировая ткань, ожирение.

Y. M. Viletska, PhD stud.
 Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,
 D. O. Minchenko, assoc. prof.
 Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,
 V. V. Davydov, prof.
 SI "Institute of Children and Adolescent Health Care, NAMS Ukraine", Kharkiv, Ukraine,
 O. H. Minchenko, prof.
 Palladin Institute of Biochemistry, Kyiv, Ukraine

THE LEVEL OF ADM, SLC1A3, HSPA5 AND PDGFC GENE EXPRESSIONS IN OBESE ADOLESCENTS AND ADULT MEN

The aim of this work was to analyze the relative level of the expression of ADM (adrenomedullin), SLC1A3 (glial high affinity glutamate transporter), HSPA5 (heat shock protein family A member 5) and PDGFC (platelet derived growth factor C) genes, which encoding poly-functional proteins, in adolescents blood and adipose tissue in adult men with obesity without insulin resistance to determine their possible role in the development of obesity and its complications. It was shown that relative expression level of SLC1A3, HSPA5 and PDGFC genes in the blood of obese adolescents without insulin resistance was significantly increased as compared to control group of relative healthy individuals of the same age without signs of obesity. At the same time, the expression level of ADM gene did not change significantly in these obese adolescents. It was also shown that in subcutaneous adipose tissue of obese adult men without insulin resistance the relative level of SLC1A3 and PDGFC gene expressions was decreased, but ADM and HSPA5 genes – increased as compared to control group. The increased level of ADM gene expression, which has hypotensive activity, controls corticotrophin, leptin, endothelin-1 and adiponectin secretion and is related to the development of insulin resistance and metabolic syndrome as well as overexpressed in malignant tumors, possibly related to the development of obesity complications including tumorigenesis. To a large extent, this also applies to increased expression of HSPA5 gene, which is involved in controlling various metabolic pathways, both in and outside cells, found in the endoplasmic reticulum, nucleus, mitochondria, and cytosol, plays an important role in the endoplasmic reticulum stress, obesity, insulin resistance and carcinogenesis. Therefore, the expression level of genes, which related to the development of obesity and endoplasmic reticulum stress as well as proliferation processes, was significantly changed in the blood and adipose tissue at obesity in gene-specific manner.

Key words: gene expressions, ADM, SLC1A3, HSPA5, PDGFC, blood, adipose tissue, obesity.

УДК 616.72-002: 577.1

А. Вовк, асп.,
 О. Короткий, канд. біол. наук,
 Д. Янковський, студ.,
 Є. Торгалло, канд. біол. наук,
 К. Дворщенко, д-р біол. наук

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ВМІСТ ТБК-АКТИВНИХ СПОЛУК І АКТИВНІСТЬ АНТИОКСИДАНТНИХ ФЕРМЕНТІВ У СИРОВАТЦІ КРОВІ ЩУРІВ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОСТЕОАРТРОЗУ І ТРИВАЛОГО ВВЕДЕННЯ МУЛЬТИПРОБІОТИКА

Досліджено дію мультипробіотика на вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів і антиоксидантних ферментів у сироватці крові щурів за умов моноіодацетат-індукованого остеоартрозу.

Дослідження проведені на білих нелінійних статевозрілих щурах-самцях масою 180–240 г із дотриманням загальних етичних принципів експериментів на тваринах. Усіх тварин поділяли на чотири експериментальні групи. Перша група – контроль: тваринам у перший день вводили в колінну зв'язку 0,05 мл 0,9 %-го розчину NaCl і щоденно, протягом 14 діб, з 8-ї по 22-гу добу вводили пергастрально 1 мл питної води в перерахунок на 1 кг маси тіла тварини. Друга група – мультипробіотик: тваринам у перший день вводили в колінну зв'язку 0,05 мл 0,9 %-го розчину NaCl і щоденно, протягом 14 діб, з 8-ї по 22-гу добу вводили пергастрально мультипробіотик "Симбітер®" ("Пролісок", Україна) дозою 140 мг/кг, розведений в 1 мл питної води на 1 кг маси тварини. Третя група – модель остеоартрозу: щурам у перший день вводили в колінну зв'язку 1 мг моноіодацетату натрію, розчиненого в 0,05 мл 0,9 %-го розчину NaCl, і щоденно, протягом 14 діб, вводили пергастрально 1 мл питної води в перерахунок на 1 кг маси тварини. Четверта група – остеоартроз + мультипробіотик: тваринам вводили в перший день у колінну зв'язку 1 мг моноіодацетату натрію, розчиненого в 0,05 мл 0,9 %-го розчину NaCl, і пергастрально – мультипробіотик дозою 140 мг/кг, розведений в 1 мл питної води на 1 кг маси тварини. Тварин умертвляли на 30 добу після початку експерименту згідно з протоколом етичного комітету, після чого швидко робили забір крові. Вміст ТБК-активних сполук визначали за реакцією з тіобарбітуровою кислотою. Супероксиддисмутазну активність оцінювали за здатністю ферменту конкурувати з нітросинім тетразолієм за супероксидні радикали. Каталазну активність вимірювали за кількістю незруйнованого пероксиду водню у пробі.

Установлено, що при моноіодацетат-індукованому остеоартрозі в сироватці крові щурів порушується окисно-антиоксидантна рівновага: збільшується вміст ТБК-активних сполук, знижується супероксиддисмутазна та зростає каталазна активність. Показано, що при тривалому введенні мультипробіотика тваринам з моноіодацетат-індукованим остеоартрозом вищевказані показники відновлювались.

Ключові слова: моноіодацетат-індукований остеоартроз, мультипробіотик, ТБК-активні сполуки, супероксиддисмутаз, каталаза, сироватка крові.

Вступ. Серед порушень опорно-рухового апарату провідне місце займають захворювання суглобів різної локалізації, які стають частою причиною звернень пацієнтів до лікаря. Розвиток патології суглобів пов'язаний із цілою низкою факторів: інфекційні захворювання, механічні травми, надлишкова вага, хвороби хребта, автоімунні процеси, порушення обміну речовин, малорушливий спосіб життя, спадкова схильність, неправильне харчування, хронічний стрес тощо. Соціальна значущість патології суглобів визначається високим ступенем розповсюдженості, багаторічним перситуванням

болю і запалення та поступовим погіршенням якості життя хворих. У зв'язку з цим профілактика та лікування захворювань суглобів є однією з важливих проблем сучасної медицини [1, 2].

Серед досліджень останніх років з'являються дані про взаємозв'язок між розвитком захворювань суглобів і станом мікрофлори травної системи [3]. Показано, що сприйнятливості мишей до розвитку колаген-індукованого артриту залежить від видового складу їхньої мікрофлори [4]. У дослідженнях, проведених Alipour і співав., показано, що у пацієнтів з ревматоїд-