

АННОТАЦИЯ

диссертации на соискания степени доктора философии (PhD) по специальности «8D05102-Биомедицина»

Есенбековой Арайлым Есенбекқызы

«Изучение экспрессии микроРНК и статуса окислительного стресса как биомаркеров сердечно-сосудистых осложнений у больных сахарным диабетом 2 типа»

Общая характеристика работы. Диссертационная работа посвящена комплексному изучению экспрессии микроРНК, статуса окислительного стресса и воспалительного процесса, а также исследованию их роли как биомаркеров сердечно-сосудистых осложнений у больных сахарным диабетом 2 типа.

Актуальность темы исследования. Сахарный диабет 2 типа является сложным метаболическим заболеванием, распространенным по всему миру, которая характеризуется гипергликемическим статусом, возникающим в результате тканевой резистентности к инсулину. Пациенты остаются бессимптомными, даже если они подвергаются действию высокого уровня глюкозы в крови, что затрудняет диагностику. Клинические параметры, используемые для диагностики заболевания, не являются специфическими, и существует необходимость в поиске циркулирующих маркеров для диагностики и прогноза заболевания. Осложнения при сахарном диабете 2 типа включают повреждение и дисфункцию жизненно важных органов, таких как зрение (ретинопатия), почки (нефропатии), нервы (нейропатии) и коронарные сосуды (сердечно-сосудистые заболевания).

Патогенез СД2Т очень сложен, включает различные патофизиологические, хронические воспалительные процессы и окислительный стресс. Изменения иммунного статуса больных, связанные с нарушением метаболизма глюкозы, приводят к эндотелиальной дисфункции сосудов. Экспрессия микроРНК влияет на окислительно-восстановительный статус и воспалительные процессы, которые являются биомаркерами сердечно-сосудистых осложнений. Существует множество исследований, посвященных экспрессии микроРНК при диабете, но его роль в сосудистых осложнениях требует дальнейшего изучения.

В последние годы интенсивно изучается небольшая некодирующая РНК - микроРНК, состоящая примерно из 18-22 нуклеотидов, которая является важным регулятором клеточных функций. МикроРНК участвуют в различных патологических процессах. МикроРНК были обнаружены и выделены из различных биологических жидкостей, включая цельную кровь, сыворотку и плазму, они являются очень стабильными молекулами и легко обнаруживаются в кровотоке. Циркулирующие микроРНК изменяют экспрессию в зависимости от физиологического состояния организма и могут помочь в прогнозировании,

диагностике и мониторинге метаболических заболеваний, включая диабет. В кровотоке были обнаружены циркулирующие микроРНК, демонстрирующие высокую стабильность и воспроизводимость. Циркулирующие микроРНК идеально подходят для предоставления клинической информации, связанной с физиологическим состоянием, демонстрируя их важную роль в патогенезе ранней диагностики сахарного диабета 2 типа. Выявление и использование биомаркеров, участвующих в патологическом прогрессировании заболевания, позволяет более точно определять процессы обострения. Эти исследования позволяют искать новые методы оценок, направленных на предотвращение сосудистых осложнений при СД2Т.

В настоящее время установлено, что окислительный стресс является компонентом метаболических нарушений при сахарном диабете и играет ключевую роль в развитии микро- и макроангиопатий при СД2Т.

Повышение окислительного метаболизма в клетке способствует максимальному высвобождению электронов в электрон-транспортной цепи, повышению окислительно-восстановительного потенциала и образованию супероксидного радикала ($O_2^{\cdot-}$).

Ранее было убедительно продемонстрировано, что хроническое воспаление тканей является ключевым фактором, способствующим развитию СД2Т. Воспаление является первой реакцией иммунной системы на повреждение тканей и важным компонентом в патогенезе многих сосудистых заболеваний, таких как атеросклероз и диабетическая ангиопатия. В связи с этим белки, продуцируемые активированными клетками иммунной системы, недостаточной специфичности к антигенам и медиаторам межклеточных коммуникаций при иммунном ответе, представляют собой гормоноподобные белковые вещества - цитокины.

В связи с вышеизложенным, весьма перспективным является комплексный и системный подход, основанный на изучении экспрессии микроРНК, статуса окислительно-восстановительного и воспалительного процесса как биомаркеров сердечно-сосудистых осложнений у больных сахарным диабетом 2 го типа.

Цель исследования.

Исследование экспрессии микроРНК, показателей окислительного стресса и воспалительного процесса в качестве новых диагностических маркеров сердечно-сосудистых осложнений у больных сахарным диабетом 2 типа.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Сравнительный анализ биохимических показателей (HbA1c, глюкоза, инсулин, индекс НОМА-IR, общий холестерин, триглицериды) в крови больных сахарным диабетом 2 типа;

2. Выявить уровень относительной экспрессии hsa-miR-21-5p и hsa-miR-126-5p в плазме крови больных сахарным диабетом 2 типа.

3. Оценить окислительно-восстановительный статус путем анализа маркеров окислительного повреждения в крови пациентов и показателей системы эндогенной антиоксидантной защиты.

4. Определить спектр маркеров воспаления (IL-6, IL-10, IL-18 и TNF- α) в плазме крови больных сахарным диабетом 2 типа и проанализировать корреляцию между маркерами воспаления, редокс-маркерами и относительным уровнем экспрессии микроРНК.

5. Изучить диагностическую ценность маркеров, связанных с присутствием сахарного диабета 2 типа и его сосудистых осложнений в исследуемых группах.

Объекты исследования: периферические образцы крови контрольной группы и пациентов с СД2Т без и с сосудистыми осложнениями.

Методы исследования. Антропометрические методы, липидный профиль (ферментативные методы), метод флуоресцентной спектроскопии Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, VT, USA), метод спектрофотометрии, метод УФ-спектрофотометрии, метод выделения нуклеиновых кислот, ПЦР с обратной транскрипцией, количественный ПЦР в реальном времени и иммуноферментный анализ (ИФА). Статистический анализ проводился при помощи IBM SPSS Statistics for MacOS, версия 20.0, графики строились с помощью программы GraphPad Prism 6.0.

Научная новизна исследования

Наиболее значимыми научными результатами диссертации являются:

- Впервые проведены мультиомиксные исследования биоматериала больных мексиканского населения, у которых были диагностированы сахарный диабет 2 типа без сердечно-сосудистых осложнений и с осложнениями.

- Исследованы циркулирующие биохимические показатели крови, (HbA_{1c}, глюкоза, инсулин, индекс НОМА-IR, общий холестерол), триглицерид у пациентов с СД2Т без и с сосудистыми осложнениями.

- Выявлен относительный уровень экспрессии свободно циркулирующих hsa-miR-21-5p, hsa-miR-126-5p в качестве биомаркеров на эпигенетическом уровне.

- Определен окислительно-восстановительный статус, связанный с окислительным стрессом у пациентов с СД2Т без и с сосудистыми осложнениями.

- Показана концентрация воспалительных цитокинов (IL-6, IL-18, IL-10, TNF- α) в плазме крови исследованных групп больных.

Полученные данные раскрывают диагностическую ценность определенных маркеров, связанных с развитием сахарного диабета 2 типа и его сосудистых осложнений в исследуемых группах.

Теоретическая значимость работы.

Результаты исследования вносят существенный вклад в определение эпигенетических механизмов диабета 2 типа, циркулирующих miR-21 и miR-126, а также биомаркеров воспаления и окислительного стресса, так как изменения экспрессии микроРНК играют важную роль в диагностике осложнения сахарного диабета и в развитии микро-, макрососудистых заболеваний.

Пациенты с сахарным диабетом осуществляют самоконтроль уровня

глюкозы в крови, чтобы снизить риск развития осложнений, таких как диабетическая ретинопатия, нейропатия и атеросклероз. Однако, несмотря на достижение хорошего контроля уровня глюкозы, у некоторых пациентов развиваются сосудистые осложнения. Механизмы, лежащие в основе метаболической памяти до конца не понятны, но предполагается, что повышенный уровень глюкозы может вызывать повреждение клеток, окружающих кровеносные сосуды, что приводит к дальнейшему нарушению их функции, это в свою очередь приводит к ухудшению микроциркуляции, увеличению риска развития тромбоза и образованию кровяных сгустков, что в конечном итоге может привести к развитию сосудистых осложнений.

Современные молекулярные биомаркеры, используемые в клинической практике для диагностики диабета, не имеют достаточной чувствительности для возникновения и течения осложненных заболеваний. Изучение эпигенетических механизмов, в частности, экспрессии микроРНК, способствует расширению границ данного исследования, дает возможность разработать новые способы диагностики и персонализированные средства лечения пациентов. Экспрессия микроРНК играет важную роль в развитии окислительного стресса и хронического воспаления, связанных с проявлением диабетических осложнений. Эти новые данные являются важным шагом в понимании молекулярных механизмов развития сахарного диабета 2 типа и его осложнений, а также могут стать основой для разработки эффективных методов диагностики и профилактики этого заболевания.

Практическая ценность работы.

Изучение факторов ферментативной и неферментативной антиоксидантной системы позволяет раскрыть особенности влияния на эффективность антиоксидантной защиты организма в развитии эндотелиальных дисфункций сосудов. Эти данные будут способствовать повышению эффективности профилактической медицины при развитии сахарного диабета 2 типа, а также разработке оптимальных протоколов ведения и лечения пациентов при риске развития осложнений.

Результаты работы внедрены в лекции, практические занятия 2 курса по дисциплинам «Молекулярная эндокринология» и «Молекулярная мембранология» для магистрантов обучающихся по образовательной программе «7M05102 - Биомедицина» кафедры биофизики, биомедицины и нейронауки факультета биологии и биотехнологии Казахского национального университета им. аль-Фараби. Акт внедрения завершённой научно-исследовательской работы в учебный процесс №3, 2023 г. (Приложение А).

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Установлено различие при сравнительном анализе биохимических показателей (HbA1c, глюкоза, индекс HOMA-IR) в крови у контрольной группы, больных СД2Т без осложнений и с осложнениями;

2. Анализирован относительный уровень экспрессии микроРНК как прогностический биомаркер у пациентов СД2Т без осложнений и с осложнениями;

3. Выявлено, что окислительно-восстановительный статус контрольной группы, больных СД2Т без сосудистых осложнений и с осложнениями отличается друг от друга;

4. Установлено, что показатели IL-6, IL-18, IL-10, TNF- α , связанные с воспалением в плазме крови, различаются в контрольной группе, у больных СД2Т без осложнений и с осложнениями, а также проведен анализ корреляционной связи полученных результатов;

5. Было предложено рассматривать hsa-miR-21-5p, СОД, ЛАТ и IL-6 в качестве прогностических маркеров, связанных с патогенезом СД2Т и возникновением сосудистых осложнений.

Личный вклад диссертанта в обобщение результатов научной работы, рекомендуемой к защите. Все результаты диссертационной работы были получены при личном участии автора. Диссертант самостоятельно провела анализ литературных данных по теме исследования, эксперименты, обработку и анализ результатов исследования, написание и оформление рукописи диссертации.

Уровень исследованности темы. Диссертационные исследования были проведены на физиологическом, биохимическом и эпигенетическом уровнях.

Связь работы с программой научных исследований.

Работа проводилась в рамках международного проекта (Project of Proper Plan 25.11.2019, CIBERfes (CB16-10-00238, ISCIII, Spain) в лаборатории «Межклеточная связь CTS-101» Центра биомедицинских исследований Университета Гранады (руководитель проекта - PhD, профессор Русанова Ирина).

Апробация работы. Основные положения диссертации и результаты исследований были доложены и обсуждены на международных научных конференциях, НАО «КазНМУ им.С.Д.Асфендиярова, РГП «Институт генетики и физиологии» КН МНВО РК, НАО «КазНЖенПУ».

Публикации. Результаты исследования были опубликованы в 20 научных работах, в том числе 4 статьи в базе данных Scopus и Web of science (Antioxidants IF-7.675, Q1; Oxidative Medicine and Cellular Longevity, IF-6.543, Q2; Journal of Pharmacy and Nutrition Sciences Q3.), 3 статьи в рекомендуемых изданиях комитетом по контролю в сфере науки и высшего образования (МНВО РК КОКСНВО), 13 тезисах в сборниках материалов международных и республиканских конференций.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа состоит из 131 страниц, нормативных ссылок, обозначений и сокращений, введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, а также результатов исследования и их обсуждения, заключения, 236 использованных источников, 11 таблиц и 29 рисунков.