

Влияние sTNFSF14 на митохондриальную динамику в печени у пациентов с ожирением

Комар А.А.¹, Скуратовская Д.А.¹, Вульф М.А.¹, Ву Х.К.¹, Даринская А.² Газатова Н.Д.¹, Тодосенко Н.М.¹, Затолокин П.А.¹, Кириенкова Е.В.¹, Литвинова Л.С.¹

¹ Балтийский федеральный университет (БФУ) им. И. Канта
Россия, 236016, г. Калининград, ул. А. Невского, 14

² Институт онкологии, Вильнюсский университет
Литовская республика, 01513, г. Вильнюс, ул. Университето, 3

РЕЗЮМЕ

Актуальность. Патогенез неалкогольной жировой болезни печени, формирующейся при ожирении и сахарном диабете (СД) 2-го типа, опосредован воздействием многочисленных воспалительных факторов на паренхиму этого органа, а также развивающейся митохондриальной дисфункцией гепатоцитов.

Цель – определение роли растворимой формы sTNFSF14 в регуляции биогенеза митохондрий в печени у больных ожирением с сахарным диабетом СД 2-го типа и без него.

Материалы и методы. В исследование включены 263 больных ожирением с СД 2-го типа и без него и 42 условно здоровых донора. Количественное определение цитокинов в плазме крови проводили методом проточной флуориметрии. Уровень относительной экспрессии генов в биоптатах печени исследовали методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. Полуколичественное определение белков в биоптатах печени проведено методом иммуноблоттинга.

Результаты. Показано, что уровни sTNFSF14, интерлейкина (IL) 10, gp130/sIL-6Rb и sIL-6Ra в плазме крови у больных ожирением без СД 2-го типа значительно превышали аналогичные значения контроля и больных ожирением с СД 2-го типа. В биоптатах печени, полученных у больных ожирением с СД 2-го типа с индексом массы тела более 40 кг/м², уровень экспрессии гена белка, подобного динамину 1 (*DRP1/DNM1L*), был ниже в сравнении с группой контроля, а уровень экспрессии гена митофузина 2 (*MFN2*) имел тенденцию к увеличению. В печени у всех больных ожирением регистрировалось повышение (в сравнении с контролем) уровня экспрессии белка НАДН-убихинона оксидоредуктазы цепи 4 (MT-ND4) и, напротив, снижение количества митохондриальной ДНК (мтДНК).

Заключение. Таким образом, sTNFSF14, взаимодействуя с IL-10 и gp130/sIL-6Rb в циркуляции, оказывает положительное воздействие на печень у больных ожирением без СД 2-го типа. Низкий уровень sTNFSF14 в плазме крови, регистрируемый у больных ожирением с СД 2-го типа, приводит к снижению деления митохондрий и увеличению клеточного дыхания у этой категории больных.

Ключевые слова: ожирение, СД 2-го типа, sTNFSF14, IL-6, gp130/sIL-6Rb, sIL-6Ra.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования. Исследование выполнено при поддержке РФФИ и Правительства Калининградской области (№ 19- 415-393004-г_мо_а, 19-44-390005- г_а); в рамках Государственного задания в области научной деятельности (№ FZWM-2020-0010); при государственной поддержке ведущих научных школ Российской Федерации (№ 2495.2020.7).

Соответствие принципам этики. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании. Исследование одобрено локальным этическим комитетом БФУ им. И. Канта (протокол № 2 от 06.03.2017).

✉ Комар Александра Андреевна, e-mail: alexandkomar@gmail.com

Для цитирования: Комар А.А., Скуратовская Д.А., Вульф М.А., Ву Х.К., Даринскас А., Газатова Н.Д., Тодосенко Н.М., Затолокин П.А., Кириенкова Е.В., Литвинова Л.С. Влияние sTNFSF14 на митохондриальную динамику в печени у пациентов с ожирением. *Бюллетень сибирской медицины*. 2021; 20 (3): 62–71. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2021-3-62-71>.

The role of sTNFSF14 in the liver mitochondrial dynamics in obese patients

Komar A.A.¹, Skuratovskaia D.A.¹, Vulf M.A.¹, Vu H.Q.¹, Darinskas A.², Gazatova N.D.¹, Todosenko N.M.¹, Zatolokin P.A.¹, Kirienkova E.V.¹, Litvinova L.S.¹

¹ *Immanuel Kant Baltic Federal University (IKBFU)
14, A. Nevskogo Str., Kaliningrad, 236016, Russian Federation*

² *National Cancer Institute, Vilnius University
3, Universiteto Str., Vilnius, 01513, Republic of Lithuania*

ABSTRACT

Background. The pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), which develops in obesity and type 2 diabetes mellitus (T2DM), is associated with the effects of inflammatory factors on the liver parenchyma and liver mitochondrial dysfunction.

Aim. To determine the role of sTNFSF14 in the regulation of liver mitochondrial biogenesis in obese patients with and without T2DM.

Materials and methods. The study included 263 obese patients with and without T2DM and 42 apparently healthy donors. Quantitative determination of cytokines in the blood plasma was performed by fluorescence flow cytometry. The level of relative gene expression in the liver biopsy samples was investigated by real-time PCR. Semi-quantitative determination of proteins in the liver biopsy samples was studied by western blotting.

Results. The study showed that the levels of sTNFSF14, interleukin (IL)-10, gp130 / sIL-6Rb, and sIL-6Ra in the blood plasma of the obese patients without T2DM significantly exceeded the similar values in the control patients and obese patients with T2DM. In the liver biopsy samples of the obese patients with T2DM and a body mass index (BMI) > 40 kg / m², the expression level of the dynamin-1-like protein (DRP1 / DNMI1) gene was lower than in the control group, and the expression level of the mitofusin 2 (MFN2) gene tended to be higher. Compared with the control group, an increase in the expression level of the NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 4 (MT-ND4) gene was recorded in the liver of all the obese patients. The patients with obesity showed a decrease in the amount of mitochondrial DNA (mtDNA) compared with the control group.

Conclusion. Thus, sTNFSF14, interacting with IL-10 and gp130 / sIL-6Rb in the circulation, positively effects the liver in the obese patients without T2DM. A low level of sTNFSF14 in the blood plasma of the obese patients with T2DM results in decreased mitochondrial division and increased cellular respiration.

Key words: obesity, type 2 diabetes mellitus, sTNFSF14, IL-6, gp130 / sIL-6Rb, sIL-6Ra.

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of financing. The research was supported by the Russian Foundation for Basic Research and Kaliningrad regional government (No. 19-415-393004-r_mol_a, 19-44-390005- r_a); the study was carried out as part of the state assignment in the field of scientific activity (No. FZWM-2020-0010) under the state support of the leading scientific schools of the Russian Federation (No. 2495.2020.7).

Conformity with the principles of ethics. All patients signed an informed consent to participate in the study. The study was approved by the local Ethics Committee at IKBFU (Protocol No. 2 of 06.03.2017).

For citation: Komar A.A., Skuratovskaia D.A., Vulf M.A., Vu H.Q., Darinskas A., Gazatova N.D., Todosenko N.M., Zatolokin P.A., Kirienkova E.V., Litvinova L.S. The role of sTNFSF14 in the liver mitochondrial dynamics in obese patients. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2021; 20 (3): 62–71. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2021-3-62-71>.

ВВЕДЕНИЕ

Ожирение – многофакторное заболевание, от которого страдает более 1/3 населения по всему миру [1]. Ожирение значительно увеличивает риск развития хронических заболеваний, таких как сахарный диабет (СД) 2-го типа, сердечно-сосудистые заболевания (атеросклероз, гипертония), неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП), некоторые виды рака [1]. Осложнения при ожирении нередко приводят к инвалидизации и смерти. Так, в 2017 г. 8% смертей в мире было связано с ожирением [1]. НАЖБП является одним из самых распространенных осложнений, формирующихся при ожирении, и занимает лидирующую позицию в гепатологии [2, 3].

Изменения функций и структуры митохондрий являются отличительной чертой при формировании НАЖБП. Гиперактивный цикл трикарбоновых кислот способствует созданию излишней нагрузки на электрон-транспортную цепь в митохондриях гепатоцитов и, таким образом, приводит к интенсификации продукции активных форм кислорода (АФК) [4]. На экспериментальных моделях НАЖБП (с дефицитом холина) было показано, что на ранних этапах развития заболевания включаются компенсаторные механизмы с участием митохондрий, но со временем резервы истощаются [5]. Несмотря на актуальность проблематики и большое количество работ, касающихся изучения этиологических факторов и аспектов патогенеза НАЖБП, в современной литературе сведения о факторах, играющих протекторную роль в развитии стеатоза и воспаления в печени при ожирении, носит крайне ограниченный характер.

Член суперсемейства фактора некроза опухоли (TNFSF) 14, также известный как LIGHT, обладает положительным эффектом при терапии различных заболеваний [6, 7]. В частности, высокий уровень sTNFSF14 в циркуляции способствует формированию противоопухолевого иммунитета при раке толстой кишки [6] и печени [7].

В настоящее время активно обсуждается роль TNFSF14 в развитии компонентов метаболического синдрома. Исследования J. Bassols и соавт. (2010) продемонстрировали более высокий уровень TNFSF14 в плазме крови у пациентов с ожирением в сравнении со здоровыми донорами [8].

У мышей с нокаутом гена *Tnfsf14* $-/-$, в условиях диеты с высоким содержанием жиров, развивается ожирение, непереносимость глюкозы, нарушение чувствительности к инсулину [9]. Кроме того, дефицит TNFSF14 у экспериментальных животных приводил к дизрегуляции митохондриального дыхания в печени, способствуя увеличению потребления кис-

лорода для дыхательной цепи переноса электронов в митохондриях [9]. Учитывая тот факт, что митохондрии играют важную роль в развитии НАЖБП при ожирении [4], изменение митохондриальной динамики (деление и слияние) и их биогенеза могут вносить существенный вклад в прогрессирование стеатоза при ожирении.

Таким образом, целью исследования явилось определение роли растворимой формы sTNFSF14 в регуляции биогенеза митохондрий в печени у больных ожирением с СД 2-го типа и без него.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Группу исследования составили 263 пациента с ожирением алиментарно-конституционального характера с абдоминальным типом локализации гиперτροφическим по морфологии. Из них 44 пациента с ожирением без СД 2-го типа с индексом массы тела (ИМТ) менее 40 кг/м² (группа 2) и 88 – с ожирением без СД 2-го типа с ИМТ > 40 кг/м² (группа 3). К группам 4 и 5 относились больные ожирением с СД 2-го типа – 42 пациента с ИМТ < 40 кг/м² и 89 пациентов с ИМТ > 40 кг/м² соответственно (таблица).

Материалом для оценки плазменных факторов (TNFSF14/LIGHT, IL-6, gp130/sIL-6Rb, sIL6-Ra и IL-10) являлась кровь, полученная путем пункции локтевой вены, взятая утром натощак в вакуумные пробирки Vacuette (Greiner-bio-one, Австрия) с ЭДТА (BD Vacutainer, Россия). Материалом для исследования уровней экспрессии мРНК генов, подсчета абсолютного числа копий митохондриальной ДНК и исследования белковой продукции служили биоптаты печени в объеме 1,0 мл каждый, полученные в ходе выполнения плановых лапароскопических операций.

Согласно ранее опубликованным нами данным, по результатам гистологического анализа, у 72,7% больных ожирением без СД 2-го типа был диагностирован стеатоз; у больных ожирением с СД 2-го типа – в 93,3%. У больных без СД 2-го типа морфологические проявления стеатогепатита обнаружены в 63,6%, у больных с СД 2-го типа – в 86,6% [10].

Группу контроля (группа 1) составили 42 условно здоровых доноров с нормальными антропометрическими и биохимическими показателями. Основные клинические характеристики изучаемых групп представлены в таблице. Данные группы были сопоставимы по возрастным и гендерным характеристикам.

Количественное определение факторов – TNFSF14/LIGHT, IL-6, gp130/sIL-6Rb, sIL6-Ra и IL-10 в плазме крови было проведено методом точной флуориметрии с использованием коммерческих тест-систем (Bio-Plex Pro Human Inflammation Panel 1, 37-Plex, Bio-Rad, США) на двухлучевом

лазерном автоматизированном анализаторе (Bio-Plex 200 Systems, Bio-Rad, США) и программы Bio-PlexManager (Bio-Rad, США).

Выделение тотальной РНК из биоптатов печени осуществлено с использованием реагента ExtractRNA (Евроген, Россия). Выделение митохондрий для анализа гена белка НАДН-убихинона оксидоредуктазы цепи 4 (*MT-ND4*) было проведено в буфере, содержа-

щем сахарозу, с последующим центрифугированием. Для определения уровня относительной экспрессии генов белка, подобного динамину 1 (*DRP1/DNM1L*), митофузина 2 (*MFN2*), *MT-ND4*, была проведена количественная полимеразная цепная реакция (ПЦР) в режиме реального времени (quantitative PCR) с использованием реагентов qPCRMix-HS (Евроген, Россия) на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad, США).

Таблица

Основные клинические показатели исследуемых групп					
Показатель	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4	Группа 5
Мужчины/женщины	17/25	11/33	18/70	18/24	21/68
Возраст, лет, $M \pm SD$	38,69 \pm 7,57	41,59 \pm 8,72	44,19 \pm 9,11	45,1 \pm 9,13	48,47 \pm 8,17
ИМТ, кг/м ² , $M \pm SD$	23,11 \pm 3,33	35,69 \pm 2,62	48,38 \pm 7,31	36,1 \pm 2,73	49,53 \pm 7,59

Выделение белковых молекул из биоптатов печени осуществлялось с использованием буфера RIPA (RIPA Buffer, ThermoFisher, США) с последующим измерением концентрации образца методом Бредфорда (BCA Protein Assay Kit, ThermoFisher, США). Для подтверждения результатов экспрессии генов был проведен полуколичественный анализ белковой продукции в биоптатах печени методом иммуноблоттинга. Полуколичественное измерение белков проведено с использованием специфических моноклональных антител DNM1L (Invitrogen, США), MFN2 (Invitrogen, США), GAPDH (Thermo Fisher, США) и систем для блоттинга (Mini-PROTEAN Tetra Systems, Trans-Blot Turbo, Bio-Rad, США). Детекция целевых белков осуществлялась на приборе ChemiDoc MP Imaging System (BioRad, США).

Для детального исследования процессов митохондриального биогенеза в образцах печени была проведена оценка абсолютного числа копий митохондриальной ДНК (мтДНК) методом цифровой капельной ПЦР (Droplet Digital PCR, ddPCR) с использованием системы QX200 Droplet Digital PCR System (BioRad, США).

Данные были проанализированы на предмет нормального распределения с использованием критерия Колмогорова – Смирнова. При нормальном распределении различия оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента (две группы, параметрический тест), при ненормальном распределении использовали критерий Манна – Уитни (две группы, непараметрический тест). Количественные переменные представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения ($M \pm SD$), медианы и интерквартильного размаха $Me (Q_{25}-Q_{75})$. Анализ взаимосвязи двух величин проводили с использованием корреляционного метода Спирмена. Статистическая значимость была установлена на уровне $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Уровень про- и противовоспалительных цитокинов в плазме крови. В группе больных ожирением без СД 2-го типа с ИМТ > 40 кг/м² значения sLIGHT/TNFSF14 в плазме крови значительно превышали аналогичные параметры контроля и больных ожирением без СД 2-го типа с ИМТ < 40 кг/м² ($p = 0,0408$), больных ожирением с СД 2-го типа с ИМТ < 40 кг/м² ($p = 0,0017$) и больных ожирением с СД 2-го типа с ИМТ > 40 кг/м² ($p < 0,0001$). Уровень sLIGHT/TNFSF14 в плазме крови был ниже в группе пациентов с ожирением и СД 2-го типа с ИМТ > 40 кг/м², чем в группе контроля ($p = 0,0003$) и группе больных ожирением без СД 2-го типа с ИМТ < 40 кг/м² ($p < 0,0001$) (рис. 1, а).

В группе больных ожирением с СД 2-го типа с ИМТ > 40 кг/м² уровень IL-10 в плазме крови был значительно выше аналогичных значений контроля ($p = 0,0002$) и ниже параметров больных ожирением без СД 2-го типа с ИМТ < 40 кг/м² ($p < 0,0001$) и ИМТ > 40 кг/м² ($p < 0,0001$). В группе больных ожирением с СД 2-го типа с ИМТ < 40 кг/м² уровень IL-10 в плазме крови был значительно ниже в сравнении с группами больных ожирением без нарушений углеводного обмена с ИМТ < 40 кг/м² ($p = 0,0019$) и с ИМТ > 40 кг/м² ($p = 0,0003$). Содержание плазменного уровня IL-10 в обеих группах больных ожирением без СД 2-го типа значительно превышало аналогичные параметры контрольной группы ($p < 0,0001$) (рис. 1, б).

Во всех исследуемых группах значения плазменного уровня IL-6 были выше относительно группы контроля ($p < 0,05$). В группе больных ожирением с СД 2-го с ИМТ > 40 кг/м² уровень IL-6 в плазме крови значительно уменьшался относительно группы больных ожирением без нарушений углеводного обмена с ИМТ < 40 кг/м² ($p = 0,0416$) (рис. 1, в).

Значения gp130/sIL-6Rb в плазме крови во всех исследуемых группах значимо отличались от группы контроля. Так, в обеих группах больных ожирением без СД 2-го типа уровень gp130/sIL-6Rb в плазме крови был значимо выше относительно группы контроля ($p = 0,0079$ и $p < 0,0001$). Напротив, в обеих группах больных ожирением с СД 2-го типа значения плазменного gp130/sIL-6Rb были ниже относительно группы контроля ($p < 0,0001$) (рис. 1, d).

Были найдены различия в уровне gp130/sIL-6Rb в плазме крови между исследуемыми группами с и без СД 2-го типа. Уровень плазменного gp130/sIL-6Rb значимо уменьшался в группе больных ожирением с СД 2-го типа с ИМТ < 40 кг/м² относительно групп больных ожирением без СД 2-го типа ($p < 0,0001$); аналогичные отличия были обнаружены с группой больных ожирением с СД 2-го типа с ИМТ > 40 кг/м²

в сравнении с группами больных ожирением без СД 2-го типа ($p < 0,0001$) (рис. 1, d).

В группах больных ожирением без СД 2-го типа с ИМТ < 40 кг/м² и ИМТ > 40 кг/м² плазменный уровень sIL-6Ra превышал аналогичные значения в группе контроля ($p = 0,0026$ и $0,0002$ соответственно). Однако в группе больных ожирением с СД 2-го типа с ИМТ > 40 кг/м² значения sIL-6Ra в плазме крови были ниже в сравнении с группой контроля ($p = 0,0024$) и обеими группами больных с ожирением без СД 2-го типа с ИМТ < 40 кг/м² ($p < 0,0001$) и с ИМТ > 40 кг/м² ($p < 0,0001$). У больных ожирением с СД 2-го типа с ИМТ < 40 кг/м² значения плазменного sIL-6Ra были значимо ниже относительно групп больных ожирением без СД 2-го типа с ИМТ < 40 кг/м² ($p = 0,0005$) и с ИМТ > 40 кг/м² ($p < 0,0001$) (рис. 1, e).

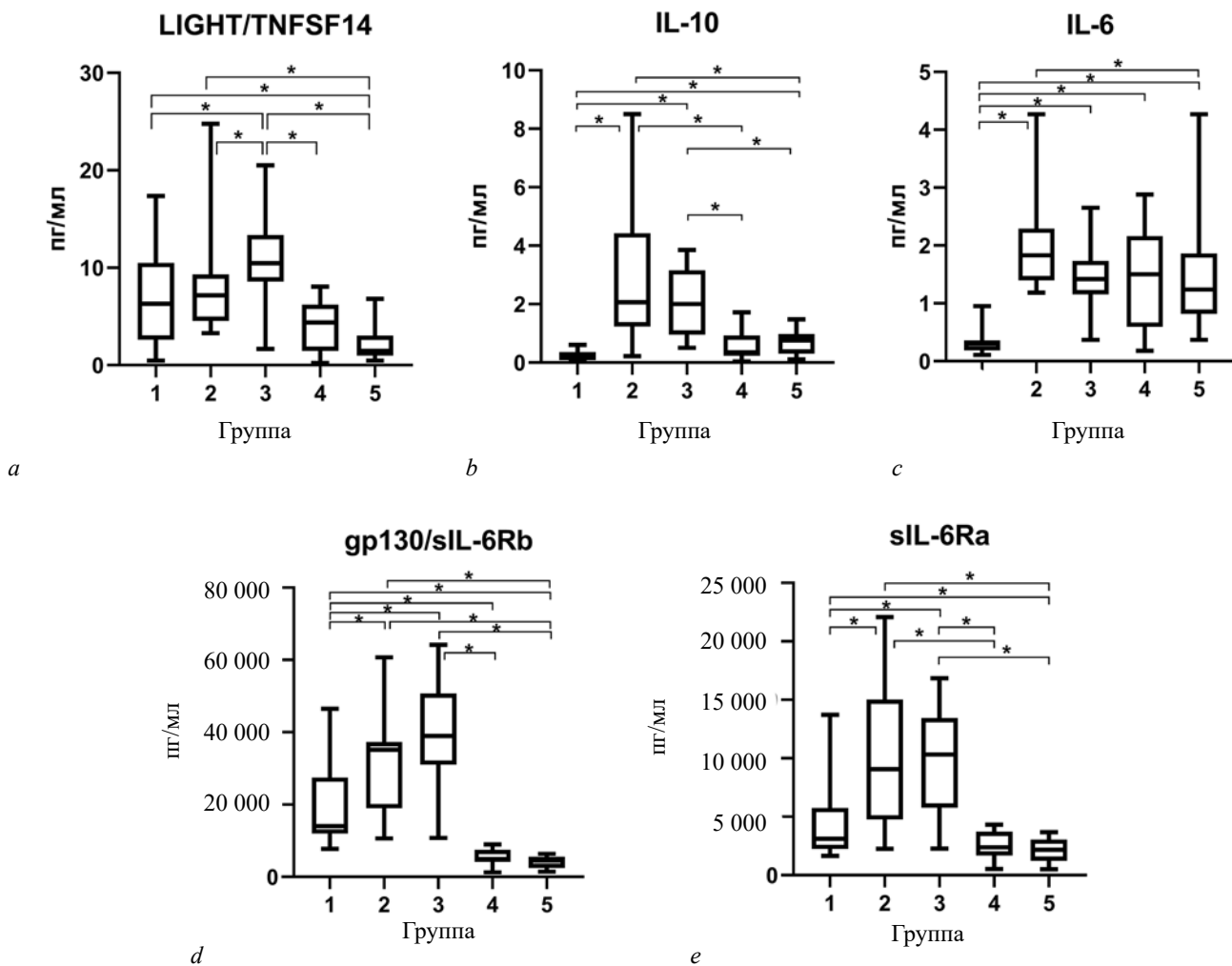


Рис. 1. Изменения уровня про- и противовоспалительных цитокинов в плазме крови. 1 – группа контроля; группа больных ожирением: 2 – без СД 2-го типа с ИМТ < 40 кг/м²; 3 – без СД 2-го типа с ИМТ > 40 кг/м²; 4 – с СД 2-го типа с ИМТ < 40 кг/м²; 5 – с СД 2-го типа с ИМТ > 40 кг/м². Уровень в плазме крови: a – sLIGHT/TNFSF14; b – IL-6; c – gp130/sIL-6Rb; d – sIL-6Ra; e – IL-10. Здесь и на рис. 2: * значимые различия между группами ($p < 0,05$)

Продукция компонентов митохондриальной динамики и биогенеза митохондрий в биоптатах печени. В группе больных ожирением с СД 2-го типа с ИМТ $> 40 \text{ кг/м}^2$ было выявлено снижение уровня экспрессии *DRP1* в печени по сравнению с контролем ($p = 0,04$) (рис. 2, *a*). Измерение относительного количества окрашивания белка DNMI1 с помощью денситометрии в группе контроля составило 0,47 у.е.; в группе больных ожирением без СД 2-го типа – 0,2, в группе больных ожирением с СД 2-го типа – 0,14 у.е.

Различий в уровне экспрессии гена *MFN2* в биоптатах печени между группами найдено не было. Несмотря на отсутствие значимой разницы регистрировалась тенденция к повышению экспрессии гена *MFN2* в биоптатах печени в группах больных ожирением с и

без СД 2-го типа с ИМТ $< 40 \text{ кг/м}^2$ относительно контроля (рис. 2, *c*). Измерение относительного количества окрашивания белка MFN2 в контрольной группе составило 0,18 у.е.; в группе больных ожирением без СД 2-го типа – 0,23 у.е.; в группе больных ожирением с СД 2-го типа – 0,35 у.е. (рис. 2, *d*).

Уровень экспрессии гена *MT-ND4* в биоптатах печени во всех группах значимо превышал аналогичные параметры контроля относительно контроля ($p = 0,0094$; $p < 0,0001$; $p = 0,0001$; $p = 0,0023$), (рис. 2, *e*). Количество мтДНК в биоптатах печени в группе больных ожирением без нарушений углеводного обмена с ИМТ $> 40 \text{ кг/м}^2$ было значимо ниже по сравнению с группой контроля и группами больных ожирением с СД 2-го типа с ИМТ $< 40 \text{ кг/м}^2$ ($p = 0,0045$) и с ИМТ $> 40 \text{ кг/м}^2$ ($p = 0,0007$) (рис. 2, *f*).

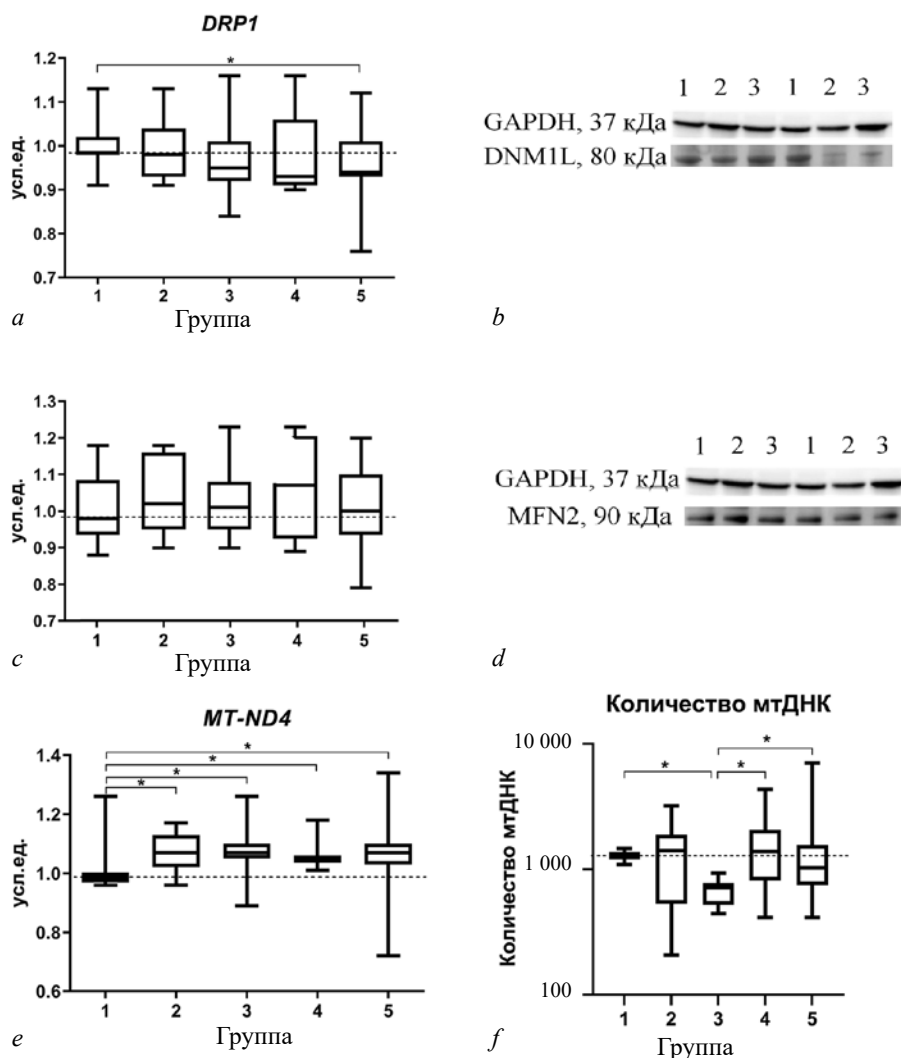


Рис. 2. Изменения уровней экспрессии генов и соответствующих белков динамики и биоэнергетики митохондрий в печени: *a* – уровень экспрессии гена *DRP1*; *b* – изображение хемилюминисценции белка DNMI1 относительно референсного белка GAPDH; *c* – уровень экспрессии гена *MFN2*; *d* – белок MFN2; *e* – уровень экспрессии гена *MT-ND4*; *f* – количество митохондриальной ДНК. *a, c, e, f*: 1 – группа контроля; группа больных ожирением: 2 – без СД 2-го типа с ИМТ $< 40 \text{ кг/м}^2$; 3 – без СД 2-го типа с ИМТ $> 40 \text{ кг/м}^2$; 4 – с СД 2-го типа с ИМТ $< 40 \text{ кг/м}^2$; 5 – с СД 2-го типа с ИМТ $> 40 \text{ кг/м}^2$; *b, d*: 1 – группа контроля; группа больных ожирением: 2 – без СД 2-го типа; 3 – с СД 2-го типа

ОБСУЖДЕНИЕ

При ожирении в печень поступает избыточное количество триглицеридов, в результате чего развивается стеатоз [11]. Прогрессированию последнего способствует увеличение секреции провоспалительных цитокинов (TNF α , IL-1 α и β) иммунными клетками [12]. Попадая в воротную вену печени, провоспалительные цитокины способны усугублять уже имеющийся высокий уровень АФК в гепатоцитах [4]. Повышенный процесс β -окисления в митохондриях приводит к накоплению токсичных липидных интермедиаторов (керамидов и диацилглицерола) [4].

В совокупности эти токсины и высокий уровень АФК запускают продукцию провоспалительных цитокинов иммунными клетками печени [4, 12]. Хроническое воспаление печени усугубляет прогрессирование НАЖБП до фиброза и цирроза [4]. В связи с этим большую актуальность приобретает поиск протекторных молекул, действие которых направлено на снижение воспаления в печени и предотвращение осложнений стеатоза.

Как уже упоминалось ранее, в патогенез ожирения и инсулинорезистентности вовлечен ряд секретруемых факторов [4, 11, 12], одним из которых является LIGHT/TNFSF14. Полученные нами данные, свидетельствующие о повышении плазменного уровня sTNFSF14 у всех пациентов с ожирением без СД 2-го типа относительно значений условно здоровых доноров и пациентов с ожирением и СД 2-го типа, согласуются с другими исследованиями [8].

Однако однозначная причина повышения уровня sLIGHT/TNFSF14 при ожирении не выяснена. Известно, что TNFSF14 продуцируется многими иммунными клетками, включая покоящиеся и активированные Т-, В-клетки, моноциты и макрофаги [13]. TNFSF14 передает сигнал через рецепторы – лимфотоксин- β (LT β R) и медиатор проникновения вируса герпеса (HVEM). Последний высоко экспрессируется в висцеральной жировой ткани и наряду с LT β R – в β -клетках поджелудочной железы [13].

В исследовании G. Tiller и соавт. (2011), проведенном на линиях клеток преадипоцитов 3T3-L1 и первичных преадипоцитах человека, показано, что LIGHT/TNFSF14 препятствует дифференцировке преадипоцитов мышей и человека в адипоциты без изменения их метаболических функций [14]. Существуют предположения, что sTNFSF14 потенциально может вносить определенный вклад в патогенез осложнений при ожирении.

Ранее было показано, что эффекты sTNFSF14 могут быть опосредованы его взаимодействием с другими цитокинами, в частности IL-6 и IL-10. Выявлено,

что IL-10 способствует подавлению воспаления, ингибируя синтез и действие провоспалительных цитокинов, в том числе TNF α , IL-1 β и IL-6, а также снижая активацию макрофагов [15]. В.М. Saunders и соавт. (2018) показали, что в печени мышей с нокаутом *Tnfsf14* $-/-$, получавших диету с высоким содержанием жиров, развивалась инсулинорезистентность и резко увеличивалась продукция IL-10, в сравнении с мышами дикого типа [9]. Такое увеличение медиатора авторы связали с компенсаторным механизмом, направленным на уменьшение воспаления в ткани печени.

В подтверждение вышесказанному нами было обнаружено значимое увеличение плазменного IL-10 у больных с ожирением без СД 2-го типа и, напротив, значительное его уменьшение у больных ожирением с СД 2-го типа (см. рис. 1, b). Кроме того, нами была выявлена положительная взаимосвязь sTNFSF14 и IL-10 у больных ожирением без и с СД 2-го типа ($r = 0,43$ и $0,4$ соответственно). Вероятно, снижение TNFSF14 и IL-10 в плазме крови у больных ожирением с СД 2-го типа играет критическую роль в прогрессировании осложнений при ожирении.

Цитокины семейства IL-6 регулируют процессы повреждения/регенерации печени, поддерживают баланс между регуляторными и эффекторными Т-клетками [16]. IL-6, один из основных игроков хронического субклинического воспаления, способствует формированию резистентности к инсулину и ухудшает гомеостаз глюкозы [16]. Так, в нашем исследовании выявлено увеличение IL-6 в плазме крови у всех пациентов с ожирением в сравнении с группой условно здоровых доноров. В группе пациентов с ожирением и СД 2-го типа нами найдена положительная взаимосвязь между IL-6 и sTNFSF14 ($r = 0,43$).

Известно, что IL-6 на поверхности клетки связывается с рецепторным комплексом, который содержит две субъединицы сигнального рецептора gp130 [17]. Нами выявлено значимое повышение содержания sIL-6Ra и gp130/sIL-6Rb в плазме крови пациентов с ожирением без СД 2-го типа в сравнении с группой контроля и пациентами с ожирением с СД 2-го типа.

Основными источниками sIL-6R являются гепатоциты и иммунные клетки [16]. IL-6, связываясь с IL-6R или sIL-6R, инициирует последующую сигнализацию через взаимодействие с gp130 [17]. Комплекс IL-6/sIL-6R действует как агонист gp130-опосредованной передачи сигналов IL-6 и называется транспередачей сигналов [17]. Данный тип передачи сигнала расширяет спектр потенциальных мишеней IL-6 практически для любого типа клеток из-за повсеместной экспрессии gp130. Однако gp130 тоже может быть в растворимой форме, из-за этого про-

исходит ингибирование транспередачи сигнала IL-6, одновременно не влияя на классический тип передачи [17]. Растворимый gp130 (sgp130) обнаруживается в кровотоке здоровых людей, сдерживая системный ответ на циркулирующий IL-6 [17]. IL-6R может иметь растворимую форму sIL-6Ra и образовывать комплекс с IL-6.

Такой комплекс IL-6 с sIL-6Ra реализует эффекты по трансигналингу, связываясь с поверхностными рецепторами gp130 [15, 16]. Так, gp130 активирует пути yes-ассоциированного белка 1 (YAP) и Notch и контролирует рост и регенерацию ткани независимо от эффективного белка преобразователя сигналов и активатора транскрипции 3 (STAT3) [18]. Обнаруженная нами положительная взаимосвязь между sIL-6Ra и gp130/sIL-6Rb в группах больных ожирением без СД 2-го типа ($r = 0,88$) и с СД 2-го типа ($r = 0,94$) может указывать на протекторную роль этих рецепторов в отношении осложнений при ожирении. Плазменное содержание sTNFSF14 в обеих группах пациентов с ожирением с СД 2-го типа и без него, независимо от ИМТ, положительно коррелировало с sIL-6Ra ($r = 0,34$ и $0,43$ соответственно) и с gp130/sIL-6Rb ($r = 0,37$ и $0,44$ соответственно). Стоит отметить, что в группе больных ожирением и СД 2-го типа была найдена положительная корреляционная взаимосвязь gp130/sIL-6Rb и IL-10 ($r = 0,3$).

Некоторые исследования продемонстрировали, что TNFSF14 непосредственно индуцирует IL-6 [16], что подтверждает предположение о регуляции продукции IL-6 посредством TNFSF14. Так, мыши с нокдауном *Tnfsf14* $-/-$ имели низкий уровень продукции IL-6 в печени по сравнению с мышами дикого типа [9]. Исходя из вышесказанного, можно предположить, что снижение продукции sTNFSF14 и IL-6 может быть одним из ключевых факторов, участвующих в прогрессировании НАЖБП при ожирении.

Митохондрии в печени контролируют энергетический метаболизм посредством синтеза АТФ и окисления жирных кислот [4]. Ранее было показано, что инсулинорезистентность связана с нарушением функций митохондрий в печени [4]. Так, дефицит TNFSF14 у мышей, получавших диету с высоким содержанием жиров, способствовал значительному увеличению потребления кислорода в печени с использованием субстратов для комплекса I, II и III по сравнению с мышами дикого типа [9].

Проведенное нами исследование митохондриальной динамики в печени при ожирении, в зависимости от отсутствия/наличия СД 2-го типа, позволило выявить следующие закономерности. Так, экспрессия гена *DRP1*, ответственного за деление митохондрий, была значимо ниже у больных ожирением с

СД 2-го типа по сравнению с контрольной группой. Что касается гена *MFN2*, ответственного за слияние митохондрий, различий между группами найдено не было, однако выявлена тенденция к увеличению данного показателя у больных ожирением с СД 2-го типа относительно контрольной группы. Это согласуется с данными количественного определения мтДНК: уменьшение (относительно контроля) количества мтДНК в печени у больных ожирением с СД 2-го типа и без него с ИМТ < 40 кг/м². Однако такое увеличение количества мтДНК приводит к интенсификации процессов дыхания в митохондриях гепатоцитов, а значит, к росту продукции АФК.

В подтверждение вышесказанному в биоптатах печени, полученных у больных ожирением с СД 2-го типа и без него, нами обнаружен более высокий (относительно контроля) уровень экспрессии гена *MT-ND4*, кодирующего субъединицу комплекса I дыхательной цепи, необходимой для окислительного фосфорилирования. Комплекс I отвечает за первый этап процесса переноса электронов от НАДН к убихинону. Затем электроны передаются от убихинона через II, III и IV комплексы для обеспечения энергии во время синтеза АТФ. Была найдена отрицательная взаимосвязь между уровнем sTNFSF14 в плазме крови и экспрессией гена *MT-ND4* ($r = -0,3$) в печени у больных ожирением без СД 2-го типа. Таким образом, уровень sTNFSF14 в плазме крови может оказывать влияние на биогенез митохондрий в печени, через взаимодействие с генами деления (*DRP1*), слияния (*MFN2*) и митохондриального дыхания печени (*MT-ND4*).

ВЫВОДЫ

Таким образом, учитывая вышесказанное, можно сделать следующие выводы:

1. Высокое содержание sTNFSF14 в плазме крови у больных ожирением без СД 2-го типа (по сравнению с контролем и больными ожирением с СД 2-го типа) оказывает протекторное действие на печень через взаимодействие gp130/sIL-6Rb и IL-10.

2. Однонаправленное снижение уровня sTNFSF14 и IL-6 в плазме крови больных ожирением с СД 2-го типа является одним из ключевых факторов, участвующих в прогрессировании НАЖБП при ожирении.

3. У больных ожирением с СД 2-го типа пониженный (по сравнению с контролем и больными ожирением без СД 2-го типа) уровень sTNFSF14 в плазме крови опосредует снижение экспрессии гена *DRP1* в печени и, напротив, увеличение экспрессии гена *MT-ND4*, что приводит к уменьшению деления митохондрий и компенсаторному увеличению митохондриального дыхания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hruby A., Hu F.B. The epidemiology of obesity: a big picture. *Pharmacoeconomics*. 2015; 33 (7): 673–689. DOI: 10.1007/s40273-014-0243-x.
2. Byrne C.D., Targher G. NAFLD: a multisystem disease. *J. Hepatol.* 2015; 62 (Suppl. 1): S47–64. DOI: 10.1016/j.jhep.2014.12.012.
3. Ивашкин В.Т., Драпкина О.М., Маев И.В., Трухманов А.С., Блинов Д.В., Пальгова Л.К., Цуканов В.В., Ушакова Т.И. Распространенность неалкогольной жировой болезни печени у пациентов амбулаторно-поликлинической практики в Российской Федерации: результаты исследования DIREG 2. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2015; 25 (6): 31–41.
4. Simões I.C.M., Fontes A., Pinton P., Zischka H., Wiecekowskij M.R. Mitochondria in non-alcoholic fatty liver disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2018; 95: 93–99. DOI: 10.1016/j.biocel.2017.12.019.
5. Ikawa-Yoshida A., Matsuo S., Kato A., Ohmori Y., Higashida A., Kaneko E., Matsumoto M. Hepatocellular carcinoma in a mouse model fed a choline-deficient, L-amino acid-defined, high-fat diet. *Int. J. Exp. Pathol.* 2017; 98 (4): 221–233. DOI: 10.1111/iep.12240.
6. Qiao G., Qin J., Kunda N., Calata J.F., Mahmud D.L., Gann P., Fu Y.X., Rosenberg S.A., Prabhakar B.S., Maker A.V. LIGHT Elevation enhances immune eradication of colon cancer metastases. *Cancer Res.* 2017; 77 (8): 1880–1891. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-16-1655.
7. Zhang H., Chen X., Li D., Cui L., Li X., Ye X., Wan X. DcR3 promotes hepatoma cell migration by downregulating E-cadherin expression. *Oncol. Rep.* 2017; 38 (1): 377–383. DOI: 10.3892/or.2017.5685.
8. Bassols J., Moreno-Navarrete J.M., Ortega F., Ricart W., Fernandez-Real J.M. LIGHT is associated with hypertriglyceridemia in obese subjects and increased cytokine secretion from cultured human adipocytes. *Int. J. Obes.* 2010; 34 (1): 146–156. DOI: 10.1038/ijo.2009.199.
9. Saunders B.M., Rudnicka C., Filipovska A., Davies S., Ward N., Hricova J., Schlaich M.P., Matthews V.B. Shining LIGHT on the metabolic role of the cytokine TNFSF14 and the implications on hepatic IL-6 production. *Immunol. Cell Biol.* 2018; 96 (1): 41–53. DOI: 10.1111/imcb.1002.
10. Вульф М.А., Кириенкова Е.В., Скуратовская Д.А., Левада Е.В., Волкова Л.В., Затолокин П.А., Газатова Н.Д., Литвинова Л.С. Факторы, способствующие развитию неалкогольной жировой болезни печени и инсулинорезистентности при ожирении. *Биомедицинская химия*. 2018; 64 (5): 444–450. DOI: 10.18097/PBMC20186405444.
11. Kaila B., Raman M. Obesity: a review of pathogenesis and management strategies. *Can. J. Gastroenterol.* 2008; 22 (1): 61–68. DOI: 10.1155/2008/609039.
12. Tzanavari T., Giannogonas P., Karalis K.P. TNF-alpha and obesity. *Curr. Dir. Autoimmun.* 2010; 11: 145–156. DOI: 10.1159/000289203.
13. Kwon B.S., Tan K.B., Ni J., Oh K.O., Lee Z.H., Kim K.K., Kim Y.J., Wang S., Gentz R., Yu G.L., Harrop J., Lyn S.D., Silverman C., Porter T.G., Trunch A., Young P.R. A newly identified member of the tumor necrosis factor receptor superfamily with a wide tissue distribution and involvement in lymphocyte activation. *J. Biol. Chem.* 1997; 272 (22): 14272–14276. DOI: 10.1074/jbc.272.22.14272.
14. Tiller G., Laumen H., Fischer-Posovszky P., Finck A., Skurk T., Keuper M., Brinkmann U., Wabitsch M., Link D., Hauner H. LIGHT (TNFSF14) inhibits adipose differentiation without affecting adipocyte metabolism. *Int. J. Obes.* 2011; 35 (2): 208–216. DOI: 10.1038/ijo.2010.126.
15. de Waal Malefyt R., Abrams J., Bennett B., Figdor C.G., de Vries J.E. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J. Exp. Med.* 1991; 174 (5): 1209–1220. DOI: 10.1084/jem.174.5.1209.
16. Rose-John S. Interleukin-6 Family Cytokines. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2018; 10 (2): a028415. DOI: 10.1101/cshperspect.a028415.
17. Reeh H., Rudolph N., Billing U., Christen H., Streif S., Bullinger E., Findeisen R., Schaper F., Huber H.J., Dittrich A. Response to IL-6 trans- and IL-6 classic signalling is determined by the ratio of the IL-6 receptor α to gp130 expression: fusing experimental insights and dynamic modelling. *Cell Commun. Signal.* 2019; 17 (1): 46. DOI: 10.1186/s12964-019-0356-0.
18. Garbers C., Aparicio-Siegmund S., Rose-John S. The IL-6/gp130/STAT3 signaling axis: recent advances towards specific inhibition. *Curr Opin. Immunol.* 2015; 34: 75–82. DOI: 10.1016/j.coi.2015.02.008.

Вклад авторов

Комар А.А., Даринская А. – анализ и интерпретация данных, разработка концепции и дизайна. Скуратовская Д.А., Вульф М.А., Газатова Н.Д. – обоснование рукописи, анализ и интерпретация данных. Тодосенко Н.М., Ву Х.К. – анализ данных. Затолокин П.А. – предоставление материалов для исследования. Кириенкова Е.В. – проверка критически важного интеллектуального содержания. Литвинова Л.С. – разработка концепции и дизайна, окончательное утверждение для публикации рукописи.

Сведения об авторах

Комар Александра Андреевна, аспирант, Центр иммунологии и клеточных биотехнологий, БФУ им. И. Канта, г. Калининград. ORCID 0000-0002-1922-3592.

Скуратовская Дарья Александровна, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, Центр иммунологии и клеточных биотехнологий, БФУ им. И. Канта, г. Калининград. ORCID 0000-0002-8679-1135.

Вульф Мария Александровна, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, Центр иммунологии и клеточных биотехнологий, БФУ им. И. Канта, г. Калининград. ORCID 0000-0002-4989-045X.

Ву Хунг Куанг, аспирант, Центр иммунологии и клеточных биотехнологий, БФУ им. И. Канта, г. Калининград. ORCID 0000-0002-4067-4718.

Даринскас Адамас, д-р мед. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория иммунологии, отдел тонкой хирургии, Институт онкологии, Вильнюсский университет, г. Вильнюс. ORCID 0000-0002-1916-7535.

Газатова Наталья Динисламовна, канд. биол. наук, зав. лабораторией экспериментальных препаратов крови, БФУ им. И. Канта, г. Калининград. ORCID 0000-0002-4646-3436.

Тодосенко Наталья Михайловна, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, Центр иммунологии и клеточных биотехнологий, БФУ им. И. Канта, г. Калининград. ORCID 0000-0001-7468-4861.

Затолокин Павел Анатольевич, канд. мед. наук, ст. науч. сотрудник, Центр иммунологии и клеточных биотехнологий, БФУ им. И. Канта, г. Калининград. ORCID 0000-0002-8631-7361.

Кириенкова Елена Витальевна, канд. мед. наук, ст. науч. сотрудник, Центр иммунологии и клеточных биотехнологий, БФУ им. И. Канта, г. Калининград. ORCID 0000-0002-5980-3321.

Литвинова Лариса Сергеевна, д-р мед. наук, директор Центра иммунологии и клеточных биотехнологий, БФУ им. И. Канта, г. Калининград. ORCID 0000-0001-5231-6910.

(✉) **Комар Александра Андреевна**, e-mail: alexandkomar@gmail.com

Поступила в редакцию 10.02.2021

Подписана в печать 25.05.2021