



Визначення молекулярних механізмів розвитку та перебігу експериментального цукрового діабету в щурів лінії Вістар

Т. В. Іваненко *

Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна

Розвиток і прогресування діабету включає кілька молекулярних механізмів: інсулінорезистентність, дисфункцію бета-клітин, запальні процеси (їх виникнення спричинене впливом цитокінів і хемокінів, що порушують сигнальні шляхи інсуліну та зумовлюють апоптоз бета-клітин), генетичні фактори (деякі форми діабету спричинені генетичними мутаціями, що впливають на вироблення інсуліну або його чутливість). Молекулярні механізми виникнення та перебігу цукрового діабету складні, включають різні аспекти фізіології та біохімії організму. Розуміння цих механізмів має вирішальне значення для розроблення ефективних методів лікування та профілактики діабету.

Мета роботи – аналіз експресії генів, пов'язаних із діабетом, у зразках тканин підшлункової залози щурів лінії Вістар.

Матеріали та методи. Для аналізу експресії генів використовували метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) зі зворотною транскрипцією в режимі реального часу за допомогою набору RTI Profiler™ PCR Array Rat Diabetes (QIAGEN, Німеччина), де об'єктом дослідження в експериментальних тварин була підшлункова залоза.

Результати. RTI Profiler™ PCR Array Rat Diabetes профілює експресію 84 генів, пов'язаних із виникненням, розвитком і прогресуванням діабету. Панель містить гени, що спричиняють ожиріння, резистентність до інсуліну, ранній початок діабету та його пізні ускладнення. Ці гени представлені функціональними категоріями: рецепторами, транспортерами та каналами; ядерними рецепторами; метаболічними ферментами; факторами секреції; білками передачі сигналу; факторами транскрипції.

У результаті ПЛР-дослідження матеріалу тварин з експериментальним цукровим діабетом встановили активність генів *Nkx2-1*, *Pik3r1*, *Slc14a2* з високою експресією порівняно з контрольною групою щурів.

Висновки. Ген *Nkx2-1* асоційований із виникненням цукрового діабету. Виявили високу активність його експресії порівняно з інтактною групою тварин. Білок *Pik3r1* має високий рівень експресії у групі тварин з експериментальним цукровим діабетом. Ці зміни пов'язані з компенсаторним механізмом, що передбачає збереження клітинного потенціалу ендокринного апарату підшлункової залози. Підвищення рівня експресії білка *SLC14A2*, що виявили, імовірно, свідчить про початок розвитку пізніх ускладнень перебігу цукрового діабету, які пов'язані з патологією нирок.

Ключові слова: щури лінії Wistar, підшлункова залоза, гени *Nkx2-1*, *Pik3r1*, *Slc14a2*.

Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. 2023. Т. 16, № 2(42). С. 154-157

Determination of molecular mechanisms of development and course of experimental diabetes mellitus in Wistar rats

T. V. Ivanenko

The development and progression of diabetes involves several molecular mechanisms, in particular: insulin resistance, dysfunction of beta cells, inflammatory processes. These mechanisms can disrupt insulin signaling pathways, contribute to beta-cell apoptosis, and are not necessarily dependent on the intervention of cytokines and chemokines. Additionally, genetics play a role, as some forms of diabetes are caused by genetic mutations affecting insulin production or sensitivity. The molecular mechanisms underlying the development and progression of diabetes are complex and encompass various aspects of the body's physiology and biochemistry. Understanding these mechanisms is crucial for the development of effective methods for treating and preventing diabetes.

The aim of the work is analysis of the expression of genes, related to diabetes in pancreatic tissue samples of Wistar rats.

Materials and methods. The polymerase chain reaction method with real-time reverse transcription was used to analyze gene expression using the RTI Profiler™ PCR Array Rat Diabetes kit (QIAGEN, Germany), where the pancreas was the object of research in experimental animals.

Results. RTI Profiler™ PCR Array Rat Diabetes profiles the expression of 84 genes, associated with the onset, development, and progression of diabetes. The panel contains genes that contribute to obesity, insulin resistance, early-onset diabetes, and its late complications. These genes are represented by functional categories: receptors, transporters, and channels; nuclear receptors; metabolic enzymes; secretion factors; signal transduction proteins; transcription factors.

ARTICLE INFO



<http://pharmed.zsmu.edu.ua/article/view/281209>

UDC 616.379-008.64-018.1-092.9
DOI: [10.14739/2409-2932.2023.2.281209](https://doi.org/10.14739/2409-2932.2023.2.281209)

Current issues in pharmacy and medicine: science and practice, 2023. 16(2), 154-157

Key words: Wistar rats, pancreas, genes *Nkx2-1*, *Pik3r1*, *Slc14a2*.

*E-mail: ivanenko.tv@zsmu.zp.ua

Received: 18.05.2023 // Revised: 30.05.2023 // Accepted: 09.06.2023

According to the PCR results of the study of the control group of animals and animals with experimental diabetes, we established the activity of the *Nkx2-1* genes; *Pik3r1*; *Slc14a2* with high expression compared to control animals.

Conclusions. The *Nkx2-1* gene has been implicated in the pathogenesis of diabetes, as evidenced by its high expression activity compared to the control group of animals. Additionally, the *Pik3r1* protein shows elevated expression levels in the group of animals with experimental diabetes. These changes are believed to be part of a compensatory mechanism aimed at preserving the cellular function of the pancreatic endocrine system. Furthermore, the observed increase in *Slc14a2* protein expression likely indicates the onset of late complications associated with kidney pathology in the course of diabetes.

Key words: Wistar rats, pancreas, genes *Nkx2-1*, *Pik3r1*, *Slc14a2*.

Current issues in pharmacy and medicine: science and practice, 2023. 16(2), 154-157

Цукровий діабет – метаболічний розлад, що характеризується високим рівнем цукру в крові через нездатність організму виробляти або належним чином використовувати інсулін. Розвиток і прогресування діабету включає кілька молекулярних механізмів: інсулінорезистентність, дисфункцію бета-клітин, запальні процеси (їх виникнення спричинене впливом цитокінів і хемокінів, що порушують сигнальні шляхи інсуліну та зумовлюють апоптоз бета-клітин), генетичні фактори (деякі форми діабету спричинені генетичними мутаціями, що впливають на вироблення інсуліну або його чутливість). Молекулярні механізми виникнення та перебігу цукрового діабету складні, включають різні аспекти фізіології та біохімії організму. Розуміння цих механізмів має вирішальне значення для розроблення ефективних методів лікування та профілактики діабету.

RTI Profiler™ PCR Array Rat Diabetes – науковий інструмент, що дає змогу одночасно аналізувати експресію сфокусованої панелі генів, пов'язаних із діабетом, у зразках тканин підшлункової залози щурів. Масив використовує зворотну транскрипцію та технологію полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у реальному часі для вимірювання рівнів експресії генів, пов'язаних з діабетом, включаючи гени, що беруть участь у передачі сигналів інсуліну, метаболізмі глюкози та функції бета-клітин підшлункової залози. Використовуючи RTI Profiler™ PCR Array Rat Diabetes, можна вивчати молекулярні механізми, що лежать в основі діабету в щурів, ідентифікувати потенційні біомаркери захворювання та оцінити вплив медикаментозних і немедикаментозних втручань на експресію генів. Цей масив можна використовувати для вивчення моделей ожиріння та діабету, для скринінгу терапевтичних засобів і їхніх мішеней, а також для оцінювання ефекту різних епідеміологічних факторів і чинників довкілля на експресію генів у різних тканинах або клітинних лініях.

Мета роботи

Аналіз експресії генів, пов'язаних із діабетом, у зразках тканин підшлункової залози щурів лінії Вістар.

Матеріали і методи дослідження

Дослідження здійснили на 10 білих щурах лінії Вістар, яких поділили на 2 групи (по 5 тварин у кожній). Тварини 1 (контрольної) групи інтактні. Щурам 2 групи одноразово внутрішньоочеревинно вводили стрептозотин

(Sigma-Chemical, США) в дозі 50 мг/кг, розчинений в 0,5 мл 0,2 М цитратного буфера pH = 4,5. Для чистоти досліду та лабораторного підтвердження розвитку цукрового діабету через 2 тижні після введення стрептозотину в усіх експериментальних тварин визначали концентрацію глюкози в крові за допомогою глюкометра GlucoCard-II (Японія).

Після декапітації експериментальних тварин під тіопенталовим наркозом (50 мг/кг) проводили забір підшлункової залози, яку фіксували в розчині Буена (20 годин), після стандартної гістологічної обробки заливали в парапласт (McComick, США).

Для аналізу експресії генів використовували метод полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією в режимі реального часу за допомогою набору RTI Profiler™ PCR Array Rat Diabetes (QIAGEN, Німеччина), де об'єктом дослідження у експериментальних тварин була підшлункова залоза.

Статистичний аналіз результатів ПЛР здійснили за допомогою програмного забезпечення PCR GeneGlobe (QIAGEN, Німеччина) з використанням $\Delta\Delta Ct$ методу [1].

Результати

Панель RTI Profiler™ PCR Array Rat Diabetes профілює експресію 84 генів, пов'язаних із виникненням, розвитком і прогресуванням діабету. Вона містить гени, що спричиняють ожиріння, резистентність до інсуліну, ранній початок діабету та його пізні ускладнення. Ці гени представлені функціональними категоріями: рецепторами, транспортерами та каналами; ядерними рецепторами; метаболічними ферментами; факторами секреції; білками передачі сигналу; факторами транскрипції. Багато з включених у панель генів мають тканиноспецифічну або тканинозаміщену модель експресії, на яку також можуть впливати різні патофізіологічні фактори розвитку патології.

За результатами ПЛР дослідження контрольної групи тварин і щурів з експериментальним цукровим діабетом, досліджувані 84 гени розрізняли за активністю: гени з високою експресією порівняно з контрольною групою тварин, де $\Delta\Delta Ct > 30$; гени з низькою експресією щодо контрольної групи, де $\Delta\Delta Ct < 30$; гени, в яких не виявили достовірні зміни в зразках порівняно з контролем (табл. 1).

Таблиця 1. Активність експресії генів у щурів з експериментальним цукровим діабетом по відношенню до показників інтактних щурів

Гени з високою експресією порівняно з контрольною групою тварин, де $\Delta\Delta\text{Ст} >30$	Гени з низькою експресією щодо контрольної групи, де $\Delta\Delta\text{Ст} <30$	Гени, в яких не виявили достовірні зміни в зразках порівняно з контролем*
<i>Nkx2-1</i> ; <i>Pik3r1</i> ; <i>Slc14a2</i>	<i>Ace</i> ; <i>Cd28</i> ; <i>Ctla4</i> ; <i>Dpp4</i> ; <i>Dusp4</i> ; <i>Enpp1</i> ; <i>Foxp3</i> ; <i>G6pc</i> ; <i>Gcgr</i> ; <i>Gck</i> ; <i>Glp1r</i> ; <i>Gpd1</i> ; <i>Gsk3b</i> ; <i>Hmox1</i> ; <i>Ide</i> ; <i>Ifng</i> ; <i>Ikbkb</i> ; <i>Il10</i> ; <i>Il6</i> ; <i>Ins1</i> ; <i>Mapk8</i> ; <i>Nfkb1</i> ; <i>Nsf</i> ; <i>Parp1</i> ; <i>Pdx1</i> ; <i>Pik3cd</i> ; <i>Ppargc1a</i> ; <i>Ptpn1</i> ; <i>Rab4a</i> ; <i>Retn</i> ; <i>Sell</i> ; <i>Snap25</i> ; <i>Sod2</i> ; <i>Stx4</i> ; <i>Stxbp1</i> ; <i>Stxbp2</i> ; <i>Tnf</i> ; <i>Tnfrsf1a</i> ; <i>Tnfrsf1b</i> ; <i>Ucp2</i> ; <i>Vamp2</i> ; <i>Vegfa</i>	<i>Acly</i> ; <i>Adra1a</i> ; <i>Adrb3</i> ; <i>Agt</i> ; <i>Akt2</i> ; <i>Aqp2</i> ; <i>Ccl5</i> ; <i>Ccr2</i> ; <i>Ceacam1</i> ; <i>Cebpa</i> ; <i>Fbp1</i> ; <i>Foxc2</i> ; <i>Foxg1</i> ; <i>Gcg</i> ; <i>Hnf1b</i> ; <i>Hnf4a</i> ; <i>Icam1</i> ; <i>Igfbp5</i> ; <i>Il12b</i> ; <i>Il4r</i> ; <i>Inpp1</i> ; <i>Irs1</i> ; <i>Irs2</i> ; <i>Mapk14</i> ; <i>Neurod1</i> ; <i>Nos3</i> ; <i>Nrf1</i> ; <i>Ppara</i> ; <i>Pparg</i> ; <i>Pygl</i> ; <i>Serpine1</i> ; <i>Slc2a4</i> ; <i>Snap23</i> ; <i>Srebf1</i> ; <i>Stxbp4</i> ; <i>Tgfb1</i> ; <i>Trib3</i> ; <i>Vamp3</i> ; <i>Vapa</i>

*: середній пороговий цикл цього гена не визначений, а отже його експресія не виявлена.

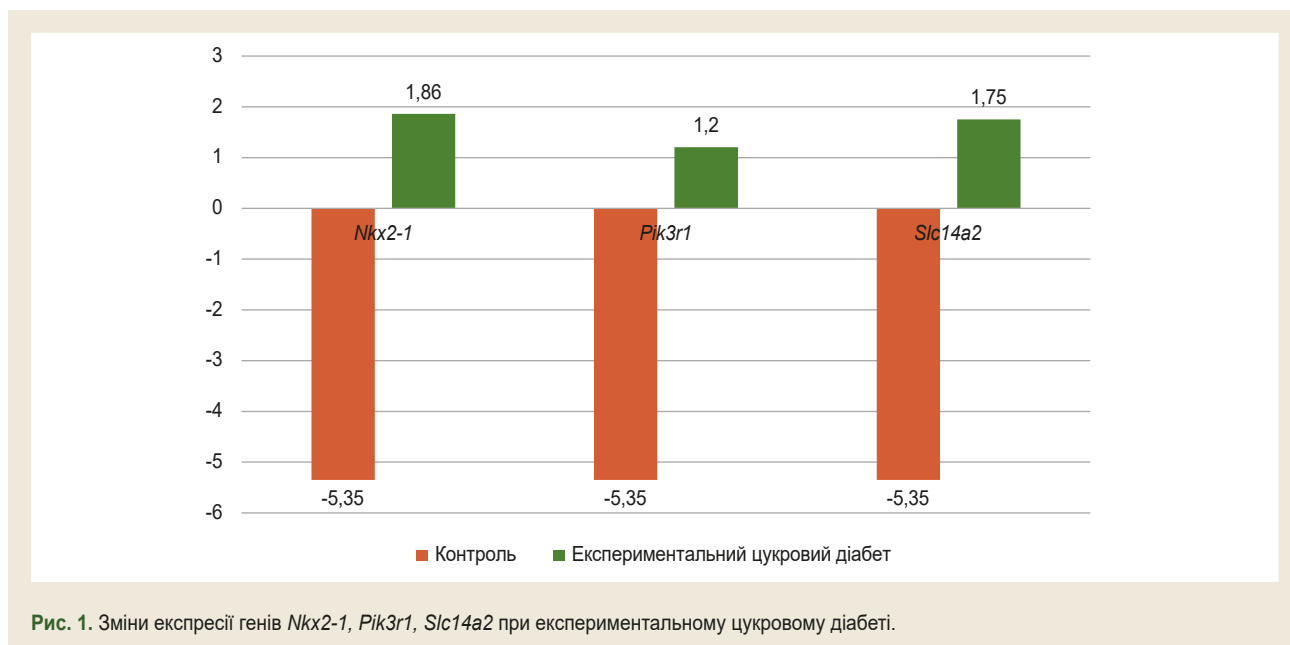


Рис. 1. Зміни експресії генів *Nkx2-1*, *Pik3r1*, *Slc14a2* при експериментальному цукровому діабеті.

Обговорення

Проаналізували експресію мРНК генів *Nkx2-1*, *Pik3r1*, *Slc14a2*, що показали високу активність (рис. 1).

Є переконливі докази, що ген *Nkx2-1* асоційований із виникненням цукрового діабету. В результаті дослідження виявили високу активність його експресії порівняно з такою в інтактній групі дослідження (табл. 1). Повідомляли, що *Nkx2-1* у пацієнтів із цукровим діабетом має вищі показники активності щодо такої в зразках хворих без цукрового діабету [2]. Втім, зауважимо, що в іншому дослідженні повідомляли про зміну характеру експресії *Nkx2-1*, яка, на думку автора, пов'язана зі зниженням активності комплексу мітохондріального м'язового дихального ланцюга, що також є характерним для цукрового діабету [3]. Зазначимо також, що знижена мітохондріальна активність є однією з характеристик діабету [4].

Ген *Pik3r1* відіграє безпосередню роль у передачі сигналів інсуліну [5]. *Pik3r1* – ключовий білок у сигнальному шляху, що регулює виживання клітин, ріст, диференціацію, передачу глюкози та її утилізацію. Дефекти в інсуліновому сигнальному каскаді мають важливе значення під час розвитку резистентності до інсуліну, що має спільну генетичну основу для метаболічних (цукровий діабет, ожиріння) та серцево-судинних захворювань [6]. У нашому дослідженні білок *Pik3r1* має високий рівень експресії,

а отже, враховуючи, що *Pik3r1* відіграє важливу роль у багатьох процесах розвитку, можна припустити: виявлені зміни є компенсаторним механізмом, що передбачає збереження клітинного потенціалу ендокринного апарату підшлункової залози. В інших дослідженнях виявлено, що аномальна експресія *Pik3r1* пов'язана з підвищеною проліферацією клітин і зниженням апоптозу [7].

Білок *Slc14a2* безпосередньо не пов'язаний із патогенезом цукрового діабету на ранніх етапах його прогресування. Ген передусім кодує білок транспортера сечовини, який бере участь у її транспортуванні через клітинні мембрани, зокрема в нирках. Хоча генетичні варіації, що наведено, можуть підвищувати ризик розвитку діабету, *SLC14A2* не вважають основним геном, який пов'язаний із цукровим діабетом, а підвищення його експресії, найімовірніше, впливає на пізні ускладнення, як-от діабетична нефропатія. У кількох дослідженнях використовували глобальні підходи, що ґрунтувалися на експресії, до вивчення повногеномних змін змісту РНК, і навіть визначення нових ідей і нових напрямів дослідження патофізіології діабетичної ниркової недостатності [8–11]. У більш ранніх дослідженнях інших науковців підтверджено, що цукровий діабет впливає на ген *SLC14A2*, який пов'язаний із водним балансом [12].

Висновки

1. Ген *Nkx2-1* асоційований із виникненням цукрового діабету. Виявили високу активність його експресії порівняно з інтактною групою тварин.

2. Білок *Pik3r1* має високий рівень експресії у групі тварин з експериментальним цукровим діабетом. Ці зміни пов'язані з компенсаторним механізмом, що передбачає збереження клітинного потенціалу ендокринного апарату підшлункової залози.

3. Підвищення рівня експресії білка *SLC14A2*, що виявили, імовірно, свідчить про початок розвитку пізніх ускладнень перебігу цукрового діабету, які пов'язані з патологією нирок.

Конфлікт інтересів: відсутній.

Conflicts of interest: author has no conflict of interest to declare.

Відомості про автора:

Іваненко Т. В., канд. мед. наук, доцент каф. патологічної фізіології з курсом нормальної фізіології, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.
ORCID ID: 0000-0001-6617-5178

Information about the author:

Ivanenko T. V., MD, PhD, Associate Professor of the Department of Pathological Physiology with Course of Normal Physiology, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.

References

- [1] Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- [2] Takematsu, E., Spencer, A., Auster, J., Chen, P. C., Graham, A., Martin, P., & Baker, A. B. (2020). Genome wide analysis of gene expression changes in skin from patients with type 2 diabetes. *PLoS one*, 15(2), e0225267. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225267>
- [3] Coon, E. A., Ahlskog, J. E., Patterson, M. C., Niu, Z., & Milone, M. (2016). Expanding Phenotypic Spectrum of NKX2-1-Related Disorders-Mitochondrial and Immunologic Dysfunction. *JAMA neurology*, 73(2), 237-238. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2015.2976>
- [4] Sivitz, W. I., & Yorek, M. A. (2010). Mitochondrial dysfunction in diabetes: from molecular mechanisms to functional significance and therapeutic opportunities. *Antioxidants & redox signaling*, 12(4), 537-577. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2531>
- [5] Rojek, A., & Niedziela, M. (2010). Insulin receptor and its relationship with different forms of insulin resistance. *Advances in Cell Biology*, 2010, 58-89. <https://doi.org/10.2478/v10052-010-0004-8>
- [6] Honardoost, M., Sarookhani, M. R., Arefian, E., & Soleimani, M. (2014). Insulin resistance associated genes and miRNAs. *Applied biochemistry and biotechnology*, 174(1), 63-80. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1014-z>
- [7] Andrade, V. P., Morrogh, M., Qin, L. X., Olvera, N., Giri, D., Muhsen, S., Sakr, R. A., Schizas, M., Ng, C. K., Arroyo, C. D., Brogi, E., Viale, A., Morrow, M., Reis-Filho, J. S., & King, T. A. (2015). Gene expression profiling of lobular carcinoma in situ reveals candidate precursor genes for invasion. *Molecular oncology*, 9(4), 772-782. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2014.12.005>
- [8] Knoll, K. E., Pietrusz, J. L., & Liang, M. (2005). Tissue-specific transcriptome responses in rats with early streptozotocin-induced diabetes. *Physiological genomics*, 21(2), 222-229. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00231.2004>
- [9] Yang, L., Brozovic, S., Xu, J., Long, Y., Kralik, P. M., Waigel, S., Zacharias, W., Zheng, S., & Epstein, P. N. (2011). Inflammatory gene expression in OVE26 diabetic kidney during the development of nephropathy. *Nephron. Experimental nephrology*, 119(1), e8-e20. <https://doi.org/10.1159/000324407>
- [10] Zheng, S., Huang, Y., Yang, L., Chen, T., Xu, J., & Epstein, P. N. (2011). Uninephrectomy of diabetic OVE26 mice greatly accelerates albuminuria, fibrosis, inflammatory cell infiltration and changes in gene expression. *Nephron. Experimental nephrology*, 119(1), e21-e32. <https://doi.org/10.1159/000327586>
- [11] Jaffa, M. A., Kobeissy, F., Al Hariri, M., Chalhoub, H., Eid, A., Ziyadeh, F. N., & Jaffa, A. A. (2012). Global renal gene expression profiling analysis in B2-kinin receptor null mice: impact of diabetes. *PLoS one*, 7(9), e44714. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044714>
- [12] Komers, R., Xu, B., Fu, Y., McClelland, A., Kantharidis, P., Mittal, A., Cohen, H. T., & Cohen, D. M. (2014). Transcriptome-based analysis of kidney gene expression changes associated with diabetes in OVE26 mice, in the presence and absence of losartan treatment. *PLoS one*, 9(5), e96987. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096987>