

Косыгина Анна Васильевна

**ГОРМОНЫ ЖИРОВОЙ ТКАНИ – АДИПОНЕКТИН И ВИСФАТИН
И ЭКСПРЕССИЯ КОНТРОЛИРУЮЩИХ ИХ ГЕНОВ
ПРИ ОЖИРЕНИИ У ДЕТЕЙ**

(14.01.02 — Эндокринология)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2011

Работа выполнена в ФГУ «Эндокринологический научный центр» Министерства
здравоохранения и социального развития Российской Федерации
(Директор – академик РАН и РАМН, профессор И.И. Дедов)

Научный руководитель:

Дедов Иван Иванович,
академик РАН и РАМН, профессор

Официальные оппоненты:

Щербакова Марина Юрьевна,
доктор медицинских наук, профессор

Ремизов Олег Валерьевич,
доктор медицинских наук

Ведущая организация:

ГОУ ДПО «Российская медицинская
академия последипломного образования»

Защита диссертации состоится « 25 » мая 2011 г. в 14 часов на заседании
диссертационного Совета Д 208.126.01 в ФГУ «Эндокринологический научный центр»
Минздравсоцразвития по адресу: Москва, ул. Дм. Ульянова, 11

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУ ЭНЦ Минздравсоцразвития
Автореферат разослан « 25 » апреля 2011 г.

Ученый секретарь диссертационного Совета
Доктор медицинских наук, профессор

Е.А. Трошина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

В последние десятилетия избыточная масса тела и ожирение стали одной из важнейших проблем для жителей большинства стран мира. По последним оценкам ВОЗ, более полутора миллиардов человек на планете имеют лишний вес, зарегистрировано более 500 млн. больных ожирением. Особенно тревожная тенденция наблюдается среди детей и подростков. Ежегодные темпы роста показателей распространенности ожирения среди детей и подростков непрерывно увеличиваются и, по данным ВОЗ, в настоящее время до десяти раз превышают уровень 1970г [Branca F. и соавт., 2007]. Нарастание числа детей с ожирением и избыточной массой тела происходит также и в России. По данным эпидемиологических исследований, в Российской Федерации распространенность избыточной массы тела у детей в разных регионах России колеблется от 5,5 до 11,8%, а ожирением страдают около 5,5% детей, проживающих в сельской местности, и 8,5% детей — в городской [Петеркова В.А. и соавт., 2004]. Детское ожирение влечет за собой как краткосрочные, так и долгосрочные неблагоприятные последствия для физического и психосоциального здоровья, и во многом является фактором риска для развития сердечнососудистых заболеваний, диабета, ортопедических проблем и психических расстройств.

Изучение этиопатогенеза ожирения является одним из приоритетных направлений в современной эндокринологии. В последние годы активно обсуждается самостоятельная роль жировой ткани в патогенезе ожирения и связанных с ним заболеваний - сахарного диабета (СД), сердечнососудистой и онкологической патологии, нарушениями в репродуктивной сфере, патологией опорно-двигательного аппарата, а также отклонениями в психическом статусе и процессах социальной адаптации.

Известно, что жировая ткань синтезирует и секретирует большое количество биологически активных пептидов, так называемых адипокинов, которые действуют как на локальном (аутокринном/паракринном) уровне, так и системно. В дополнение к этому, жировая ткань экспрессирует ряд рецепторов, которые позволяют отвечать на афферентные сигналы внутренних органов и центральной нервной системы. Таким образом, жировая ткань вовлечена в координацию многих биологических процессов, включая метаболизм энергии, нейроэндокринные и иммунные процессы.

Увеличение массы жировой ткани, особенно ее висцерального компонента, ассоциировано с инсулинорезистентностью, гипергликемией, дислипидемией, нарушением коагуляции, активацией воспаления, что приводит к развитию сахарного диабета. Вместе с тем, самостоятельная роль висцерального и подкожного депо в развитии тех или иных метаболических нарушений у детей и

подростков на сегодняшний день изучена недостаточно. Предполагается что, изучение физиологических особенностей жировой ткани в детском возрасте позволит выделить диагностические маркеры метаболических нарушений.

Цель исследования

Исследовать молекулярно-генетические и гормональные особенности подкожного и висцерального депо жировой ткани и определить клиническое значение исследований гормонов жировой ткани – адипонектина и висфатина - при ожирении у детей и подростков.

Задачи исследования

1. Исследовать содержание адипокинов – адипонектина, висфатина - в сыворотке крови у детей и их взаимосвязь с возрастом, стадией полового развития и основными антропометрическими характеристиками;
2. Изучить особенности содержания адипокинов в сыворотке крови при ожирении у детей, в зависимости от степени ожирения и наличия метаболических осложнений;
3. Исследовать экспрессию генов адипонектина – *ADIPOQ*, висфатина - *PBEF1*, рецепторов, активируемых пролифераторами пероксисом γ 1 и 2 - *PPARG* и каннабиноидного рецептора 1 типа - *CNR1* в висцеральной и подкожной жировой ткани у детей и их взаимосвязь с ИМТ;
4. Проанализировать взаимосвязь между уровнем экспрессии генов в жировой ткани, возрастом, стадией полового развития, основными антропометрическими характеристиками и содержанием адипокинов в сыворотке крови.

Научная новизна

Впервые в мировой и отечественной практике были исследованы особенности экспрессии генов *ADIPOQ*, *PBEF1*, *PPARG1*, *PPARG2* и *CNR1* в висцеральной и подкожной жировой ткани у детей с нормальной массой тела, избытком массы тела и ожирением. Была определена взаимосвязь между уровнем экспрессии генов в жировой ткани, содержанием адипокинов сыворотки крови, а также между этими показателями и основными антропометрическими индексами и стадией полового развития. Получены данные об изменении содержания адипокинов в крови при ожирении у детей и подростков. Определена взаимосвязь между содержанием адипокинов сыворотки крови и метаболическими нарушениями, ассоциированными с ожирением.

Практическая значимость

Получены данные о прогрессивном снижении содержания адипонектина сыворотки крови по мере полового созревания и отрицательной взаимосвязи с показателями ИМТ и ОТ у здоровых детей. Выявлено значимое снижение уровня адипонектина у детей с ожирением, особенно выраженное при наличии инсулинорезистентности.

Показана четкая взаимосвязь уровня висфатина сыворотки крови с массой жировой ткани у детей с ожирением, а также взаимосвязь сывороточной концентрации висфатина с инсулинорезистентностью и дислипидемией.

Разработана методика определения уровня экспрессии генов в висцеральной и подкожной жировой ткани.

Исследована экспрессия генов адипонектина, висфатина, рецепторов, активируемых пролифераторами пероксисом гамма 1 и 2 типов и каннабиноидных рецепторов 1 типа (КБ1) в жировой ткани у здоровых детей и детей с избыточной массой тела и ожирением. Получены данные о депо-специфических различиях экспрессии генов висфатина - *PBEF1* и рецептора *PPARG2* в подкожной и висцеральной жировой ткани у детей. Показано преобладание экспрессии гена рецептора, активируемого пролифераторами пероксисом гамма 1 типа в жировой ткани. Выявлена ассоциация экспрессии генов рецепторов *PPAR γ* и КБ1 с уровнем экспрессии генов адипокинов.

Апробация работы

Основные результаты исследования по материалам диссертации были доложены на Съезде Европейского и Американского Обществ Детских Эндокринологов (Нью Йорк, сентябрь 2009г.), Всероссийском конгрессе «Современные технологии в эндокринологии» (Москва, ноябрь 2009г.), межотделенческой научной конференции ФГУ ЭНЦ Росмедтехнологий (Москва, июнь 2010г.), II Международном симпозиуме «Ожирение у подростков» (Сербия, март 2011г.).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 7 научных работ, из них 4 статьи в журналах, рецензируемых ВАК РФ.

Объем и структура работы

Диссертация изложена на 139 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и указателя списка литературы, который содержит 7 отечественных и 232 иностранных источников. Диссертация иллюстрирована 32 таблицами и 20 рисунками.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы исследования:

Содержание адипокинов в сыворотке крови было исследовано у 111 детей и подростков, в числе которых 56 пациентов с «простым» конституционально-экзогенным ожирением, SDS ИМТ 2,98 [2,7 ÷ 3,4], в возрасте от 3,4 до 17,5 лет, 12 детей с избыточной массой тела, SDS ИМТ 1,65 [1,5 ÷ 1,8], в возрасте от 10,5 до 16,5 лет и группа детей с нормальным весом - 43 ребенка, SDS ИМТ 0,3 [-0,36 ÷ 0,7] в возрасте от 2,5 до 17,9 лет, табл. 1.

Таблица 1.

Характеристика обследованных пациентов.

	Нормальный вес n = 43	Избыток веса n = 12	Ожирение n = 56	p
Возраст, годы	11,7 [6,6 ÷ 15,1]	14,5 [13,6 ÷ 15,5]	13,6 [12,4 ÷ 14,8]	<0,05 *
Пол, м/д	20/23	7/5	27/29	>0,05 #
Половое развитие				
Таннер 1	20 (47 %)	1 (8%)	9 (18 %)	< 0,05*, **
Таннер 2–3	15 (35 %)	9 (75%)	22 (39 %)	< 0,05*, ***
Таннер 4–5	8 (19 %)	2 (17%)	24 (43 %)	< 0,05**, ***
SDS роста	0,33 [-0,47 ÷ 0,8]	0,39 [0,1 ÷ 0,83]	1,16 [0,5 ÷ 1,98]	<0,01 **
ОТ, см	62 [52 ÷ 70]	82 [79 ÷ 86,5]	102 [97 ÷ 111]	<0,01 **, ***; <0,05 *
ИМТ, кг/м²	18,4 [15,4 ÷ 20,9]	24,5 [23,5 ÷ 25,7]	31,1 [28,7 ÷ 35,2]	<0,01 **, ***; <0,05 *
SDS ИМТ	0,3 [-0,36 ÷ 0,72]	1,66 [1,5 ÷ 1,8]	2,98 [2,7 ÷ 3,4]	<0,01 **, ***; <0,05 *

Примечание: Данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха. Различия достоверны между группами: * - нормальный вес - избыток веса; ** - нормальный вес – ожирение; *** - избыток веса - ожирение; # - между всеми группами.

Экспрессия генов в висцеральной и подкожной жировой ткани была исследована у 62 детей с различными показателями ИМТ, подвергшихся плановым оперативным лапароскопическим вмешательствам (герниотомия, пластика пищеводного отверстия диафрагмы и др.). Критериями исключения являлись сопутствующая хроническая патология, острые воспалительные заболевания (аппендицит, острый холецистит). Все дети, включенные в исследование, не имели патологических отклонений в общеклиническом и биохимическом анализах крови и анализе мочи. Все включенные в исследование дети были разделены на две группы в зависимости от показателя SDS ИМТ: 1 группа – дети с нормальной массой тела (SDS ИМТ < 1,5); 2 группа – дети с избытком массы тела и ожирением (SDS ИМТ > 1,5). Клиническая характеристика пациентов представлена в таблице 2.

Характеристика обследованных пациентов.

	Все n = 62	Нормальный вес n = 43	Избыток веса n = 19	p
Возраст, годы	13,6 [8,5 ÷ 15,1]	11,7 [6,6 ÷ 15,1]	14 [13,4 ÷ 15,1]	0,02
Пол, м/д	31/31	20/23	11/8	>0,05
Половое развитие				
Таннер 1 (I)	21 (34%)	20 (47%)	1 (5%)	<0,05
Таннер 2–3(II)	28 (45%)	15 (35%)	13 (68%)	<0,05
Таннер 4–5 (III)	13 (21%)	8 (19%)	5 (26%)	>0,05
SDS роста	0,34 [-0,36 ÷ 0,98]	0,33 [-0,47 ÷ 0,8]	0,46 [0,04 ÷ 1,35]	>0,05
ОТ, см	70 [56 ÷ 78]	62 [52 ÷ 70]	85 [78 ÷ 95]	<0,01
ИМТ, кг/м ²	20,8 [16,5 ÷ 23,6]	18,4 [15,4 ÷ 20,9]	26,1 [23,7 ÷ 27,3]	<0,01
SDS имт	0,65 [-0,07 ÷ 1,46]	0,29 [-0,36 ÷ 0,72]	1,92 [1,6 ÷ 2,4]	<0,01

Примечание: Данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха. Различия достоверны между группами: нормальный вес и избыток веса.

Методы исследования:

Общеклиническое обследование (сбор анамнеза, осмотр, антропометрия, оценка физического и полового развития) пациентов проводилось в Институте детской эндокринологии ФГУ ЭНЦ (директор — проф. В.А. Петеркова) и на кафедре детской хирургии МГМСУ (зав. кафедрой – проф. И.В. Поддубный).

Антропометрические измерения включали: измерение роста, веса, окружности талии, в соответствии с принятыми правилами, каждое измерение проводилось трижды, после чего вычислялось среднее значение. Обработка антропометрических данных проводилась с учетом пола и возраста пациента и оценивалась в стандартных отклонениях (SDS — standard deviation score) от среднего. Для оценки степени отклонения роста пациентов от среднего роста в популяции рассчитывался коэффициент стандартного отклонения SDS роста по следующей формуле: $SDS = \frac{X - X'}{SD}$, где X – рост пациента, X' – средний рост для данного хронологического возраста и пола, SD – стандартное отклонение для данного хронологического возраста и пола. Индекс массы тела (ИМТ) рассчитывался как отношение массы тела (кг) к длине тела (м), возведенной в квадрат. ИМТ оценивался индивидуально по нормативам для конкретного возраста и пола и был представлен в виде числа стандартных отклонений от среднего (SDS). SDS ИМТ рассчитывался как $\frac{X - X'}{SD}$, где X – lg ИМТ пациента, X' – lg среднего ИМТ для данного хронологического возраста и пола, SD – lg стандартного отклонения ИМТ для данного хронологического возраста и пола. При расчете SDS весоростовых показателей пациентов использовались популяционные данные, используемые в базе KIGS: SDS роста пациентов – данные Tanner J, Whitehouse H [1966, 1976], SDS ИМТ – данные Freeman

J, Cole T [1995]. Диагностическим критерием избыточного веса считался SDS ИМТ > 1,5 <2; диагностическим критерием ожирения считался SDS ИМТ > 2.0.

Оценка полового статуса проводилась согласно классификации Tanner [1968]. Объем тестикул измерялся с помощью орхидометра Prader.

Гормональные исследования проводились в лаборатории гормонального анализа ФГУ ЭНЦ (рук. – проф. Н.П. Гончаров) и включали определение адипонектина методом иммуноферментного анализа с помощью набора Human Adiponectin ELISA, фирмы BioVendor, висфатина методом иммуноферментного анализа с помощью набора Visfatin C-terminal (human), фирмы Phoenix Pharmaceuticals inc., иммунореактивного инсулина (ИРИ) иммунохемоллюминисцентным методом на аппарате «Elecsys 2010», Roche, Германия.

Биохимические исследования сыворотки крови – липидограмма (общий холестерин, ХС-ЛПНП, ХС-ЛПВП, ТГ), печеночные ферменты (АСТ, АЛТ) и глюкоза - проводилось в биохимической лаборатории ФГУ ЭНЦ (рук. – А.В. Ильин) ферментативным способом на биохимическом анализаторе «Spectrum II» (Abbott, США).

Показатели липидов и липопротеидов считали нормальными при уровне холестерина < 5,2 ммоль/л; ХС-ЛПВП > 1,1 ммоль/л; ХС-ЛПНП < 3,0 ммоль/л; ТГ < 1,2 ммоль/л.

Состояние углеводного обмена и секреции инсулина оценивали по результатам стандартного перорального глюкозотолерантного теста (ОГТТ) с глюкозой из расчета 1,75 г/кг, но не более 75 г сухого вещества на основании рекомендаций ВОЗ (1998). Нормальной считалась концентрация глюкозы в венозной плазме натощак <6,1 ммоль/л; глюкоза венозной плазмы на 120 мин ОГТТ <7,8 ммоль/л. Для оценки инсулинорезистентности использовались индексы - НОМА-IR и индекс Matsuda:

$$\text{НОМА-IR} = (\text{ИРИ}_0 \times \text{Г}_{\text{л0}}) / 22,5$$

$$\text{ISI Matsuda} = 10000 / \sqrt{(\text{ИРИ}_0 \times \text{Г}_{\text{л0}} \times \text{ИРИ}_{\text{сред}} \times \text{Г}_{\text{лсред}})},$$

где ИРИ — иммунореактивный инсулин, Ед/л; Гл — глюкоза, ммоль/л. ИРИ₀, Г_{л0} — инсулин и глюкоза плазмы натощак; ИРИ_{сред}, Г_{лсред} — средний уровень инсулина и глюкозы при проведении ОГТТ.

Ультразвуковое исследование органов брюшной полости проводили по общепринятой методике в отделении функциональной диагностики ФГУ ЭНЦ (зав. отделением функциональной диагностики ФГУ ЭНЦ – Т.В. Солдатова) на ультразвуковых аппаратах Hewlett Packard Image Point(США), Agilent Sonos 4500 (США) с использованием линейного трансабдоминального датчика с частотой 3,5МГц.

Определение композиционного состава тела проводили в отделении функциональной диагностики ФГУ ЭНЦ (зав. отделением функциональной диагностики ФГУ ЭНЦ – Т.В. Солдатова) методом рентгеновской денситометрии по протоколу «Total body» на аппарате Prodigy Oracle.

Определение экспрессии генов в образцах висцеральной и подкожной жировой ткани проводилось в лаборатории ООО «ДНК-синтез» (руководитель — к.б.н. В.А. Сосунов) методом полимеразной цепной реакции в «реальном времени». Выделение РНК из жировой ткани проводилось с помощью набора SV Total RNA Isolation System (Promega). После выделения РНК обрабатывалась ДНКазой (RQ1 RNase-Free DNase, Promega), и еще раз очищалась с помощью набора SV Total RNA Isolation System (Promega). Полученная РНК хранилась при температуре -70°C до проведения анализа. Синтез кДНК проводился из полученной РНК с помощью набора First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) (в реакцию брали 2 мкг РНК, полученную кДНК разводили до 200 мкл). Уровень экспрессии генов интереса оценивался относительно экспрессии гена *B2M*.

Таблица 3.

Последовательности праймеров и зондов.

Ген	Праймер	Зонд
<i>ADIPOQ</i> (<i>HUMAN</i>)	F = GGTTTCACCGATGTCTCCCTT R = CGTGATGGCAGAGATGGCA	FAM- CCTGGATCTCCTTTCTCACCCCTTCTCA- BHQ1
<i>PBEF1</i>	F = TGTTGTAАСТААТGGCCTTGGGA R = ATCCCTGCTGGCGTCCTAT	FAM- CTTCAAGGACCCAGTTGCTGATCCC- BHQ1
<i>PPARG1</i>	F = GTGGCCGCAGAAATGACC R = CCACGGAGCTGATCCCAA	FAM- AGAGATGCCATTCTGGCCCACCAACTT- BHQ1
<i>PPARG2</i>	F=GATACACTGTCTGCAAACATATCACAA R = CCACGGAGCTGATCCCAA	FAM- AGAGATGCCATTCTGGCCCACCAACTT- BHQ1
<i>CNRI</i>	F = AAGACGGTGTТТGCATTCTG R = GTCGCAGGTCCTTACTCCTC	Зонда нет, реакцию проводили в присутствии красителя SYBR Green I

Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета прикладных программ Statistica (StatSoft Inc., USA, version 8.0). Так как большинство изучаемых показателей не имело приближенно-нормального распределения, все данные представлены в виде медианы и интерквартильных размахов – Me [X1/4 ÷ X3/4]. Статистическая обработка полученных результатов проводилась с помощью непараметрических критериев статистического анализа. Для сравнения двух независимых выборок по количественным признакам использовался критерий Манна-Уитни, по качественным признакам – критерий χ^2 (хи-квадрат). Для сравнения двух зависимых выборок – критерий Вилкоксона, для сравнения более двух независимых выборок – ранговый анализ вариаций по методу Краскела-Уоллеса, с последующим попарным сравнением групп. Для анализа связи двух

признаков использовался анализ ранговой корреляции по Спирмену и гамма-корреляции. Критический уровень значимости различий принимали равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Клиническая значимость определения адипокинов сыворотки крови у детей с ожирением

Адипонектин сыворотки крови

Адипонектин – уникальный адипокин, обладающий антидиабетической, противовоспалительной и антиатерогенной активностью. Этот белок с молекулярной массой 30кДа, обладает высокой степенью сродства к коллагену VIII и X-типов и C1q компоненту комплемента. Адипонектин был идентифицирован четырьмя независимыми группами исследователей в 1995 и 1996 годах, использовавших различные методы его выделения, поэтому ему были даны различные названия: apM1 (Adipose Most abundant Gene transcript 1), Acrp30 (Adipocyte complement related protein), adipoQ и GBP28 (gelatine binding protein 28). В крови адипонектин циркулирует в виде нескольких изоформ (тример, гексамер, мультимер); при этом наибольшей биологической активностью обладает высокомолекулярная форма адипонектина. У взрослых людей содержание циркулирующего адипонектина в кровотоке значительно – около 10-16 мкг/мл, что составляет 0,1% от общего количества белка сыворотки крови. Снижение уровня адипонектина сыворотки крови выявляется у людей, страдающих ожирением, СД2, артериальной гипертонией, дислипидемией и ИБС. Более того во взрослой популяции низкий уровень адипонектина (менее 4,0 мкг/мл) является независимым фактором риска развития СД2 и дислипидемий.

Уровень адипонектина сыворотки крови был исследован у 111 детей, из них 56 пациентов с ожирением (27 мальчиков/29 девочек), в возрасте от 3,5 до 17,5 лет (13,6 [12,4 ÷ 14,8] лет), SDS ИМТ 2,98 [2,7 ÷ 3,36], 12 детей с избыточной массой тела, SDS ИМТ 1,65 [1,5 ÷ 1,8], в возрасте от 10,5 до 16,5 лет (14,5 [13,6 ÷ 15,5] лет) и дети с нормальным весом - 43 ребенка SDS ИМТ 0,3 [-0,36 ÷ 0,7] в возрасте от 2,5 до 17,9 лет (11,7 [6,6 ÷ 15,1] лет).

Сывороточная концентрация адипонектина в группе детей с нормальной массой тела составила 9,6 [7,78 ÷ 12,1] мкг/мл, в группе с избыточной массой тела содержание адипонектина было ниже – 8,55 [6,06 ÷ 10,2] мкг/мл, но статистически незначимо ($p > 0,05$). Концентрация адипонектина в сыворотке крови в группе детей с ожирением составила 6,9 [4,9 ÷ 10,2] мкг/мл, статистически значимо ниже, чем в группе детей без ожирения ($p = 0,009$).

Выявлено что наиболее высокий уровень адипонектина отмечается у детей в препубертате и прогрессивно снижается по мере полового созревания ($\gamma = -0,34$, $p = 0,0006$, где γ – коэффициент корреляции гамма). Дисперсионный анализ показал статистически значимые отличия сывороточной концентрации адипонектина в зависимости от стадии полового развития между группами Таннер 1 и

Таннер 4-5 ($p = 0,04$). Было отмечено, что у мальчиков имеется более выраженное снижение уровня адипонектина по мере полового созревания. В работе Bottner A. и соавт. [2004], было показано, что снижение уровня адипонектина в пубертате ассоциировано с повышением концентраций андрогенов сыворотки крови – тестостерона и ДГЭА-С и при проведении регрессионного анализа в группе мальчиков с нормальным весом стадия полового развития была более сильным предиктором снижения сывороточного содержания адипонектина, чем показатель ИМТ. Также были продемонстрированы данные о том, что тестостерон ингибирует секрецию адипонектина адипоцитами, не изменяя уровень мРНК гена *ADIPOQ*, что предполагает посттранскрипционный характер регуляции продукции адипонектина тестостероном [Nishizawa H., 2002].

По данным исследований на взрослой популяции уровень адипонектина сыворотки крови значительно выше у женщин, что может указывать на участие половых гормонов в регуляции секреции адипонектина. Однако нами не было выявлено различий в содержании адипонектина в зависимости от пола обследованных детей.

Уровень адипонектина сыворотки крови отрицательно коррелировался с показателями ИМТ ($R = - 0,33$, $p < 0,001$), SDS ИМТ ($R = - 0,27$, $p = 0,003$). и ОТ ($R = - 0,38$, $p < 0,001$), где R – коэффициент корреляции Спирмена.

В то же время в группе детей с ожирением уровень адипонектина не был ассоциирован с показателем SDS ИМТ ($R = 0,14$, $p = 0,3$, где R – коэффициент корреляции Спирмена) и при проведении дисперсионного анализа не было выявлено статистически значимых отличий при сравнении групп детей с различными степенями ожирения, рис. 1.

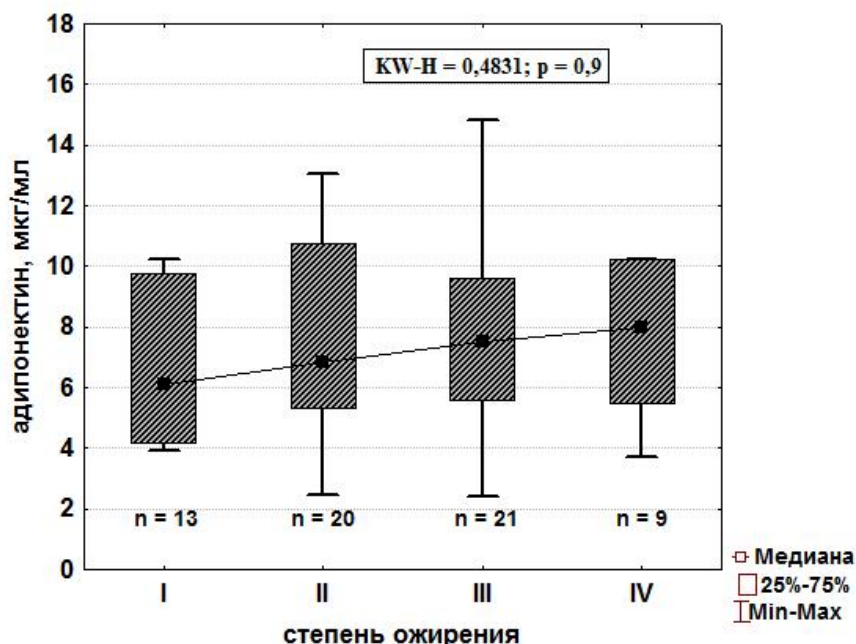


Рисунок 1. Адипонектин сыворотки крови у детей с ожирением.

Согласно данным исследования Yamauchi T. и соавт. [2003], содержание адипонектина в сыворотке крови в большей степени ассоциировано не с показателем ИМТ, а с объемом висцеральной жировой ткани, оцененной с помощью визуализирующих методов (МРТ или КТ). В ряде работ были продемонстрированы противоречивые данные о корреляционной взаимосвязи уровня адипонектина и общего количества жировой ткани [Nemet D., 2003, Schoppen S., 2010].

В нашей работе мы не выявили зависимости между содержанием адипонектина в сыворотке крови и процентным содержанием жировой ткани, оцененным методом рентгеновской денситометрии в режиме «Total body» у детей с ожирением: ($R = 0,18$, $p = 0,4$), где R – коэффициент корреляции Спирмена).

По данным литературы низкий уровень адипонектина сыворотки крови, так называемая «гипоадипонектинемия», является независимым предиктором развития нарушений углеводного и липидного обмена, СД 2 и сердечно-сосудистой патологии.

По нашим данным уровень адипонектина сыворотки крови был статистически значимо ниже в группе детей с ожирением, осложненным инсулинорезистентностью (табл. 4).

Таблица 4.

Уровень адипонектина сыворотки крови у детей с ожирением в зависимости от наличия инсулинорезистентности.

	ИР « + » n = 41	ИР « - » n = 15	p
Возраст, годы	13,6 [12,6 ÷ 14,8]	13,6 [10,9 ÷ 14,8]	> 0,05
Вес, кг	88,7 [78 ÷ 104,6]	84 [71,7 ÷ 92,6]	> 0,05
ИМТ, кг/м²	31,1 [28,3 ÷ 35,8]	31,2 [30,5 ÷ 31,9]	> 0,05
SDS ИМТ	3,03 [2,7 ÷ 3,4]	2,94 [2,7 ÷ 3,3]	> 0,05
ОТ, см	102 [97 ÷ 111]	102 [96,5 ÷ 106]	> 0,05
НОМА-IR	4,21 [3,5 ÷ 6,65]	1,97 [1,6 ÷ 2,5]	<0,0001
ISI Matsuda	2,2 [1,64 ÷ 2,7]	4,25 [3,8 ÷ 4,64]	<0,0001
Адипонектин, мкг/мл	6,3 [4,2 ÷ 8,35]	10,44 [6,9 ÷ 12,2]	0,01

Корреляционный анализ выявил достоверную взаимосвязь уровня адипонектина сыворотки со следующими показателями:

- ИРИ 0 мин.: $R = - 0,36$ ($p = 0,01$)
- ИРИ 90 мин.: $R = - 0,44$ ($p = 0,003$)
- НОМА-IR: $R = - 0,33$ ($p = 0,02$), где R – коэффициент корреляции Спирмена.

Уровень адипонектина сыворотки крови положительно коррелировался с показателем индекса ISI Matsuda: $R = 0,27$, однако статистически незначимо ($p = 0,07$). Корреляционных ассоциаций между уровнем адипонектина и глюкозой сыворотки крови выявлено не было.

По данным исследований во взрослой популяции низкий уровень адипонектина взаимосвязан с развитием дислипидемий [Matsubara M., 2002]. В работе Kettaneh A. и соавт. [2006], была показана прямая корреляционная взаимосвязь адипонектина сыворотки крови с уровнем ЛПВП и негативная с уровнем ТГ у детей.

При анализе показателей липидного обмена (общий холестерин, триглицериды, холестерин ЛПНП и ЛПВП) среди обследованных пациентов с ожирением у 14 % (8 детей) отмечалась гиперхолестеринемия, повышение уровня триглицеридов было выявлено у 44,5 % (25 детей), повышение ХС-ЛПНП – у 37% (21 ребенок) и снижение ХС-ЛПВП у 54% (30 детей). В 50% случаев (28 пациентов) имела место смешанная дислипидемия, с повышением уровней ТГ и ХС-ЛПНП и/или снижением ХС-ЛПВП. У 24% пациентов (12 детей) показатели липидов сыворотки крови были в пределах нормальных значений.

Не было выявлено статистически значимого различия содержания адипонектина сыворотки крови в группах детей в зависимости от наличия дислипидемии. При проведении корреляционного анализа отмечалась тенденция к прямой корреляционной взаимосвязи уровня адипонектина сыворотки крови с показателем ХС-ЛПВП и негативной с ТГ (ХС-ЛПВП: $R = 0,21$, $p = 0,1$; ТГ: $R = - 0,21$, $p = 0,1$).

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о взаимосвязи адипонектина с ожирением и его метаболическими осложнениями у детей. Более того нами выявлено, что в группе детей с ожирением низкий уровень адипонектина ассоциирован не со степенью ожирения, а с наличием гиперинсулинемии и инсулинорезистентности.

Висфатин сыворотки крови

Висфатин был выделен в 2004 году группой японских исследователей как гормон, который продуцируется преимущественно висцеральной жировой тканью и обладает инсулиномиметическими свойствами [Fukuhara A., 2005]. Висфатин - 52- кДа белок с кристаллической структурой, циркулирующий в кровотоке в виде мономерных и димерных форм и обладающий свойствами цитокина и фермента, участвующего в биосинтезе никотинамид-аденин-динуклеотида (НАД). Концентрации висфатина в плазме относительно невысоки (нг/мл), и по отношению к циркулирующему инсулину составляют около 3 - 10 %. На сегодняшний день нет единого представления о физиологической и патофизиологической роли висфатина, однако данные последних исследований позволяют предположить вовлеченность этого адипокина в патогенез развития связанных с ожирением метаболических нарушений. Количество работ посвященных исследованию клинической значимости этого адипокина у детей ограничено.

Уровень висфатина сыворотки крови был исследован у 77 детей и подростков: 25 пациентов с ожирением (12 мальчиков/13 девочек), 14 [12,8 ÷ 14,5] лет), SDS ИМТ 2,8 [2,6 ÷ 3,3], 12 детей с

избыточной массой тела, 14,5 [13,6 ÷ 15,5] лет, SDS ИМТ 1,6 [1,5 ÷ 1,8], и 40 детей с нормальным весом 12,4 [6,8 ÷ 15,2] лет, SDS ИМТ 0,3 [-0,3 ÷ 0,7].

По результатам нашего исследования не было обнаружено статистически значимого различия содержания висфатина в сыворотке крови у детей с нормальным весом и пациентов с ожирением. Так сывороточная концентрация висфатина в группе детей с нормальной массой тела составила 9,2 [7,4 ÷ 11,6] нг/мл, в группе с избыточной массой тела – 9,2 [7,8 ÷ 10,8] нг/мл, и в группе детей с ожирением - 9,73 [8,6 ÷ 10,8] нг/мл ($p > 0,05$).

Уровень висфатина сыворотки крови у мальчиков и девочек был практически одинаков: 9,4 [8,2 ÷ 10,8] нг/мл против 9,6 [7,7 ÷ 11,0] нг/мл ($p > 0,05$).

Исследуя особенности содержания висфатина в сыворотке крови у детей, мы выявили, что концентрация этого адипокина нарастает по мере полового развития, однако статистически незначимо.

Согласно данным некоторых исследований уровень висфатина сыворотки крови повышен у лиц с ожирением и прямо коррелируется с показателями ИМТ и ОТ [Berndt J., 2005, Davutoglu M., 2009]. В нашем исследовании не было выявлено статистически значимых взаимосвязей между уровнем висфатина сыворотки крови, возрастом и основными антропометрическими показателями у здоровых детей.

При анализе группы детей с ожирением было выявлено, что у мальчиков уровень висфатина сыворотки крови отрицательно коррелируется с показателями ИМТ ($R = - 0,79$; $p = 0,002$) и SDS ИМТ ($R = - 0,79$; $p = 0,002$), в то время как в группе обследованных девочек корреляционная связь уровня висфатина с данными показателями была положительной и статистически незначимой: ИМТ ($R = 0,15$; $p = 0,6$); SDS ИМТ ($R = 0,13$; $p = 0,6$).

По данным ряда исследований у взрослых людей концентрация висфатина в сыворотке крови положительно коррелируется с объемом висцеральной жировой ткани, оцененным визуализирующими методами, и может служить суррогатным маркером аккумуляции висцерального жира, ведущей к развитию метаболического синдрома [Fukuhara A., 2005, Sethi J.K., 2005]. В другом исследовании уровень висфатина плазмы положительно коррелировался с ИМТ и процентным содержанием жировой ткани, но не было выявлено такой зависимости от возраста, соотношения окружности талии и бедер и объема висцеральной жировой ткани [Berndt J., 2005].

По данным нашего исследования, корреляционный анализ выявил сильную прямую взаимосвязь сывороточной концентрации висфатина с процентным содержанием жировой ткани, оцененным методом рентгеновской денситометрии ($n = 17$; $R = 0,77$; $p = 0,0003$).

Данные литературы о взаимосвязи висфатина сыворотки крови с метаболическими осложнениями ожирения крайне противоречивы. Количество работ посвященных исследованию висфатина при ожирении у детей ограничено. По результатам нашего исследования, не было выявлено

статистически значимой корреляционной взаимосвязи уровня висфатина сыворотки крови с показателями инсулина и гликемии, как базальных, так и при проведении ОГТТ. Однако в группе детей с подтвержденной инсулинорезистентностью концентрация висфатина была достоверно выше (табл. 5).

Таблица 5.

Уровень висфатина сыворотки крови детей с ожирением в зависимости от наличия инсулинорезистентности.

	ИР « + » n = 14	ИР « - » n = 5	p
Возраст, годы	13,9 [12,5 ÷ 14,5]	14,3 [13,8 ÷ 14,7]	> 0,05
ИМТ, кг/м²	32,5 [28,8 ÷ 36,8]	31,0 [30,4 ÷ 33,2]	> 0,05
SDS ИМТ	3,2 [2,7 ÷ 3,4]	2,8 [2,7 ÷ 3,1]	> 0,05
ОТ, см	102,7 [100 ÷ 110]	96 [94,5 ÷ 107,3]	> 0,05
НОМА-IR	4,4 [3,9 ÷ 6,65]	1,8 [1,3 ÷ 2,2]	0,001
ISI Matsuda	2,1 [1,64 ÷ 2,7]	3,9 [3,5 ÷ 4,25]	0,002
Висфатин, нг/мл	9,8 [9,1 ÷ 10,8]	8,5 [8,2 ÷ 8,9]	0,02

При анализе взаимосвязи уровня висфатина сыворотки крови с липидным профилем детей с ожирением была обнаружена положительная корреляция с показателями холестерина, триглицеридов и ХС-ЛПНП и негативная корреляция с ХС-ЛПВП, однако эти коэффициенты были статистически незначимы:

- Холестерин: R = 0,4, p = 0,06;
- ТГ: R = 0,16, p = 0,5;
- ХС-ЛПВП: R = - 0,26, p = 0,2;
- ХС-ЛПНП: R = 0,42, p = 0,07, где R – коэффициент корреляции Спирмена.

Экспрессия генов адипонектина (*ADIPOQ*), висфатина (*PBEF1*), рецепторов активируемых пролифераторами пероксисом гамма 1 и 2 типа (*PPARG1* и 2) и каннабиноидного рецептора 1 типа (*CNRI*) в жировой ткани у детей

Экспрессия гена адипонектина - ADIPOQ в висцеральной и подкожной жировой ткани

Адипонектин экспрессируется зрелыми адипоцитами. По данным ряда авторов, у взрослых людей ген *ADIPOQ* экспрессируется преимущественно в подкожной жировой ткани и его экспрессия снижена при ожирении. В исследовании Li X. и соавт. [2008], было выявлено, что в группе детей с избыточной массой тела экспрессия гена адипонектина снижена в висцеральной жировой ткани.

Экспрессия гена *ADIPOQ* в подкожной и висцеральной жировой ткани была проанализирована у 51 пациента (мальчики/девочки - 28/23), медиана возраста составила 13,6 [8,5 ÷ 15,1] лет.

Не было выявлено достоверных различий между уровнями экспрессии гена адипонектина в подкожной и висцеральной жировой ткани. Не отмечалось значимых отличий экспрессии гена *ADIPOQ* в жировой ткани в зависимости от пола обследованных детей. Однако у мальчиков отмечалась тенденция к более высокой экспрессии гена *ADIPOQ* в висцеральной жировой ткани - 4,05 [3,14 ÷ 4,94] против 3,5 [2,68 ÷ 3,9] в подкожной жировой ткани ($p = 0,08$).

При сравнении групп детей с нормальным весом и детей с избыточной массой тела, обнаружено, что уровень экспрессии гена *ADIPOQ* в подкожной и висцеральной жировой ткани выше в группе детей с избытком веса и ожирением на 22% и 22,6% соответственно, однако статистически незначимо ($p > 0,05$).

Корреляционный анализ не выявил значимой взаимосвязи экспрессии гена *ADIPOQ* с возрастом обследованных детей. Однако была выявлена статистически значимая корреляционная взаимосвязь между уровнем экспрессии гена *ADIPOQ* в подкожной жировой ткани и ростом ($R = 0,31$, $p = 0,02$), весом ($R = 0,33$, $p = 0,01$), ОТ ($R = 0,3$, $p = 0,027$), ИМТ ($R = 0,36$, $p = 0,007$) и SDS ИМТ ($R = 0,33$, $p = 0,01$). Экспрессия *ADIPOQ* в висцеральной жировой ткани коррелировалась с ростом ($R = 0,39$, $p = 0,002$), весом ($R = 0,34$, $p = 0,008$), ОТ ($R = 0,33$, $p = 0,009$) и ИМТ ($R = 0,3$, $p = 0,02$).

Было обнаружено, что наиболее высокий уровень экспрессии гена как в висцеральной, так и в подкожной жировой ткани отмечается у детей на стадии полового развития Таннер 2 – 3, рис.2. Статистически значимые отличия были выявлены между группами Таннер 1 и Таннер 2 – 3: *ADIPOQ* вжт ($p = 0,003$), *ADIPOQ* пжт ($p = 0,03$).

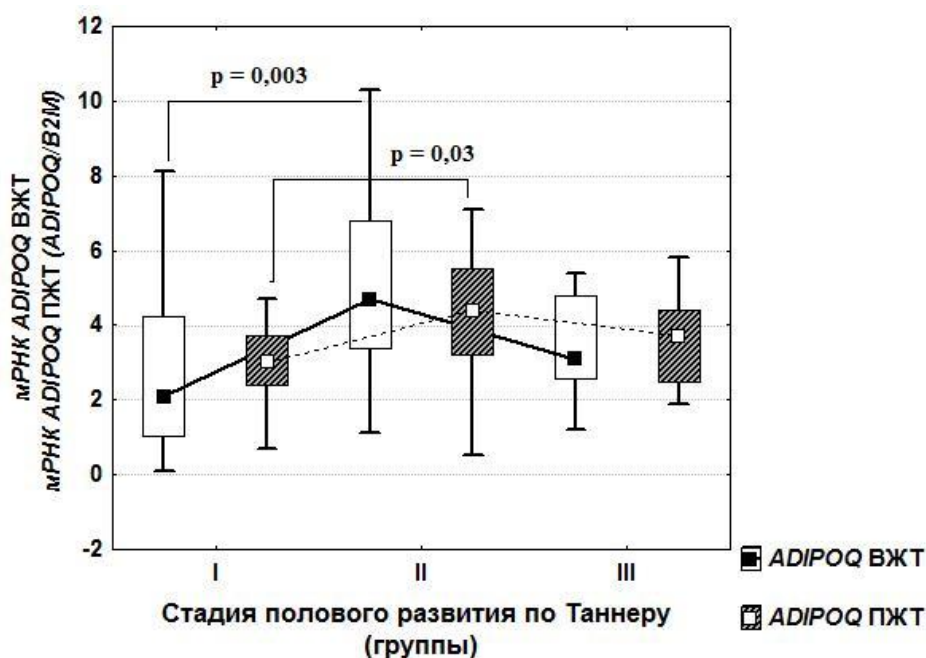


Рисунок 2. Экспрессия гена *ADIPOQ* в висцеральной и подкожной жировой ткани в зависимости от стадии полового развития.

Известно, что в период пубертата происходит значительное изменение гормонального профиля и композиционного состава тела. В этот период происходит увеличение общего количества жировой ткани и в особенности ее висцерального компонента, развивается так называемая пубертатная инсулинорезистентность. В генезе данного феномена немаловажную роль играют физиологические изменения в оси гормон роста – инсулиноподобный фактор роста 1 (ГР - ИФР-1), а также изменение уровней кортикостероидов и половых стероидов в сыворотке крови. Вполне вероятно, что эти же факторы могут влиять и на уровень экспрессии генов адипокинов. Так в исследовании Lindquist S. с соавт. [2007], было выявлено, что у детей по мере полового созревания в висцеральной жировой ткани происходит увеличение экспрессии 11β – гидроксистероиддегидрогеназы типа 1, фермента участвующего в биосинтезе кортизола и вследствие этого повышается локальная концентрация кортизола, что может оказывать влияние на экспрессию и секрецию адипонектина.

Обнаружено, что уровень мРНК *ADIPOQ* в подкожной жировой ткани отрицательно коррелируется с содержанием адипонектина в сыворотке крови ($R = -0,47$, $p = 0,0003$), в то время как экспрессия гена в висцеральной жировой ткани не ассоциирована с данным показателем ($R = -0,1$, $p = 0,4$), что указывает на сложные механизмы посттранскрипционной регуляции секреции адипонектина жировой тканью и подтверждает данные предыдущих исследований [Behre C.J., 2007, Savu M.K., 2009].

Экспрессия гена висфатина – PBEF1 - в висцеральной и подкожной жировой ткани у детей

В ряде работ были продемонстрированы противоречивые данные о депо-специфических особенностях экспрессии гена *PBEF1* в жировой ткани [Fukuhara A., 2005, Varma, V., 2007]. По данным Fukuhara A. с соавт. [2005], висфатин в основном экспрессируется в висцеральной жировой ткани, тогда как в других исследованиях не было обнаружено достоверных различий в уровне мРНК *PBEF1* между висцеральной и подкожной жировой тканью. Работ посвященных исследованию экспрессии данного гена в жировой ткани у детей до настоящего времени не проводилось.

Экспрессия гена *PBEF1* была исследована в парных образцах подкожной и висцеральной жировой ткани у 60 детей (30/30 - мальчики/ девочки), 13,8 лет [8,1 ÷ 15,1 лет].

Нами было выявлено, что уровень экспрессии гена *PBEF1* статистически значимо выше в висцеральной жировой ткани в группе всех обследованных детей ($p = 0,002$) и у детей с нормальной массой тела ($p = 0,002$), тогда как в группе детей с избытком веса уровень мРНК висфатина в висцеральной и подкожной жировой ткани практически не отличался ($p = 0,3$).

При сравнении групп детей с нормальной массой тела и избытком веса не было выявлено достоверных отличий экспрессии гена *PBEF1* в висцеральной ($p = 0,37$) и подкожной ($p = 0,85$) жировой ткани. Также не было выявлено значимых отличий экспрессии гена *PBEF1* в висцеральной и подкожной жировой ткани в зависимости от половой принадлежности обследованных детей. Однако

только в группе мальчиков отмечалось преобладание экспрессии гена *PBEF1* в висцеральной жировой ткани - 5,7 [4,7 ÷ 6,8] против 4,6 [4,2 ÷ 5,7] в подкожной жировой ткани ($p = 0,002$), тогда как у девочек ген *PBEF1* экспрессировался без значимых депо-специфичных отличий - *PBEF1* ВЖТ – 5,1 [3,7÷ 6,3], *PBEF1* ПЖТ – 5,0 [3,9 ÷6,1], ($p = 0,29$).

Мы выявили, что наиболее высокий уровень мРНК гена висфатина отмечается у детей в препубертате и отрицательно коррелируется со стадией полового развития по Таннеру (*PBEF1* ВЖТ $\gamma = -0,24$, $p = 0,02$; *PBEF1* ПЖТ $\gamma = -0,25$, $p = 0,02$, где γ – коэффициент корреляции гамма).

В ряде исследований была продемонстрирована взаимосвязь между уровнем экспрессии гена *PBEF1* в жировой ткани с антропометрическими показателями. Так в работе Berndt J. с соавт. [2005], была выявлена положительная корреляция экспрессии гена висфатина в висцеральной жировой ткани с ИМТ и процентом жировой ткани, оцененной с помощью денситометрии, в то время как уровень экспрессии *PBEF1* в подкожной жировой ткани не был ассоциирован с этими показателями. В другом исследовании экспрессия гена висфатина в подкожной жировой ткани отрицательно коррелировалась с ИМТ [Kovacikova M., 2008].

В нашей работе корреляционный анализ по Спирмену не выявил статистически значимой взаимосвязи между уровнем экспрессии гена *PBEF1* в висцеральной и подкожной жировой ткани, возрастом обследованных детей и основными антропометрическими показателями, за исключением положительной корреляции с показателем SDS роста (*PBEF1* ПЖТ: $R = 0,32$, $p = 0,02$; *PBEF1* ВЖТ: $R = 0,28$, $p = 0,02$). В группе обследованных девочек выявлена статистически значимая отрицательная корреляционная связь уровня мРНК висфатина в висцеральной жировой ткани и величиной окружности талии ($R = - 0,36$, $p = 0,04$).

При анализе взаимосвязи экспрессии гена *PBEF1* в жировой ткани с сывороточным содержанием висфатина было выявлено, что сывороточная концентрация висфатина не ассоциирована с экспрессией гена *PBEF1* в жировой ткани (*PBEF1*ПЖТ: $R = - 0,06$, $p = 0,6$; *PBEF1*ВЖТ: $R = - 0,06$, $p = 0,6$), что подтверждает данные о том, что жировая ткань не является главным ресурсом циркулирующего висфатина.

Экспрессия гена каннабиноидного рецептора тип 1 – CNR1 - в висцеральной и подкожной жировой ткани у детей

Каннабиноидный рецептор тип 1, кодируемый геном *CNR1* (6q14 - q15) высоко экспрессируется в центральной нервной системе, а также в ряде периферических тканей, включая печень, мышцы и жировую ткань. Активация каннабиноидных рецепторов в ЦНС приводит к повышению потребления пищи. По данным исследований *in vitro* и *in vivo* в адипоцитах активация этих рецепторов стимулирует липогенез, способствует утилизации глюкозы, модулирует экспрессию и секрецию адипокинов. По данным ряда авторов при ожирении наблюдается так называемая неадекватная активация

эндоканнабиноидной системы, выражающаяся в повышении экспрессии всех ее составляющих [Engeli S., 2005]. В нескольких исследованиях были продемонстрированы противоречивые данные о депо-специфических особенностях экспрессии гена *CNR1* в жировой ткани. По данным Bluher M. с соавт. [2006], экспрессия каннабиноидного рецептора 1 типа преобладает в висцеральной жировой ткани, тогда как другие исследования не обнаружили такой особенности [Lofgren P., 2007].

Исследование экспрессии гена каннабиноидного рецептора 1 типа было проведено в парных образцах подкожной и висцеральной жировой ткани у 60 детей (30/30 - мальчики/ девочки), 13,8 [8,1 ÷ 15,1] лет.

Нами выявлено, что ген *CNR1* экспрессируется в подкожной и висцеральной жировой ткани без значимых депо-специфических отличий. Также не было найдено разницы в уровнях мРНК гена *CNR1* между группами обследованных детей с нормальной и избыточной массой тела.

При изучении особенностей экспрессии гена каннабиноидного рецептора тип 1 в зависимости от половой принадлежности было выявлено, что у мальчиков отмечается более высокий уровень экспрессии гена *CNR1* как в висцеральной, так и в подкожной жировой ткани по сравнению с группой обследованных девочек, однако статистически значимые различия были найдены только для висцерального депо жировой ткани ($p = 0,045$).

При анализе особенностей экспрессии гена *CNR1* в жировой ткани, было отмечено, что наиболее высокий уровень мРНК гена каннабиноидного рецептора 1 отмечается у детей в стадии пубертата Таннер 2 – 3, статистически значимые отличия были выявлены для экспрессии гена *CNR1* в висцеральной жировой ткани ($p = 0,04$). Дисперсионный анализ выявил статистически значимые отличия уровня экспрессии гена *CNR1* в висцеральной жировой ткани в зависимости от пубертата только в группе обследованных девочек ($p = 0,016$; Таннер 2-3/Таннер 4-5, $p = 0,02$).

В исследованиях посвященных экспрессии гена каннабиноидного рецептора 1 типа в жировой ткани получены достаточно расходящиеся данные о взаимосвязи экспрессии гена *CNR1* с антропометрическими показателями. В частности, в работе Bluher M. и соавт. [2006], была продемонстрирована взаимосвязь между уровнем экспрессии гена *CNR1* в жировой ткани с величиной ИМТ, объемом висцеральной жировой ткани, однако в ряде других исследований, значимых корреляций экспрессии гена *CNR1* с данными клиническими показателями выявлено не было.

В нашей работе корреляционный анализ по Спирмену не выявил статистически значимых взаимосвязей между уровнем экспрессии гена *CNR1* в висцеральной и подкожной жировой ткани возрастом обследованных детей и основными антропометрическими показателями, за исключением слабой положительной корреляции экспрессии гена в подкожной жировой ткани с показателями роста ($R = 0,33$, $p = 0,014$) и SDS роста ($R = 0,27$, $p = 0,03$).

Экспрессия гена рецептора, активируемого пролифераторами пероксисом γ 1 и γ 2 - PPARG1 и PPARG2 - в висцеральной и подкожной жировой ткани у детей

Рецепторы, активируемые пролифераторами пероксисом гамма – PPAR γ -принадлежат к суперсемейству ядерных рецепторов, входящих в группу факторов транскрипции, которые контролируют экспрессию ряда генов, связанных с передачей эффектов инсулина на клетки и участвующих в контроле уровня глюкозы и метаболизме липидов. В настоящее время рецепторы PPAR γ считаются одними из центральных регуляторов энергетического гомеостаза организма животных и человека. Хотя PPAR γ найдены во многих тканях, в основном они экспрессируются в жировой ткани. Существует три изоформы PPAR γ , которые кодируются одним геном - *PPARG*, локализованном на коротком плече 3 хромосомы (3p25), но имеют разные промотеры и подвергаются альтернативному сплайсингу. В исследовании Zhang J. и соавт. [2004], при анализе уровня экспрессии разных изоформ гена *PPARG* было показано, что у лиц с избыточной массой тела значительно увеличена экспрессия в жировой ткани изоформы PPAR γ 2 по сравнению с худыми людьми. Работ посвященных изучению особенностей экспрессии гена рецептора PPAR γ в педиатрической популяции крайне мало. По данным исследования Li X. с соавт. [2008], у детей с избыточной массой тела снижена экспрессия гена *PPARG* в висцеральной жировой ткани.

Экспрессия гена *PPARG* исследована в парных образцах висцеральной и подкожной жировой ткани у 57 пациентов (29/28 – мальчики/девочки), медиана возраста которых составила 13,9 лет [7,6 ÷ 15,1].

Особенности экспрессии гена PPARG1

По результатам нашего исследования было выявлено, что ген *PPARG1* экспрессируется в подкожной и висцеральной жировой ткани без значимых депо-специфических отличий. Также не было найдено разницы в уровнях мРНК гена *PPARG1* между группами обследованных детей с нормальной и избыточной массой тела. Не было выявлено различий экспрессии гена *PPARG1* в зависимости от пола обследованных детей.

При анализе особенностей экспрессии гена *PPARG1* в жировой ткани, было отмечено, что наиболее высокий уровень мРНК гена рецептора, активируемого пролифераторами пероксисом γ 1 отмечается у детей в стадии пубертата Таннер 2 – 3, однако статистически незначимо ($p > 0,05$).

При проведении дисперсионного анализа статистически значимые отличия уровня экспрессии гена *PPARG1* в зависимости от стадии полового развития были отмечены в висцеральной жировой ткани только в группе обследованных мальчиков ($p = 0,04$; Таннер1/Таннер4-5, $p = 0,04$).

Особенности экспрессии гена *PPARG2*

Было обнаружено, что ген рецептора *PPAR γ 2* более высоко экспрессируется в подкожной жировой ткани, в группе детей с нормальным весом выявлены статистически значимые различия ($p = 0,02$), в то время как у детей с избытком массы тела ген *PPARG2* экспрессировался без значимых депоспецифичных отличий.

По данным нашего исследования не выявлено достоверных отличий уровня экспрессии гена *PPARG2* в зависимости от пола обследованных детей и от стадии полового развития.

Корреляционный анализ по Спирмену не выявил значимых корреляционных взаимосвязей экспрессии гена *PPARG2* в жировой ткани с возрастом и антропометрическими показателями обследованных детей, в то же время уровень мРНК *PPARG1* положительно коррелировался с показателями роста и веса. Несмотря на отсутствие статистически значимых отличий между показателями экспрессии гена *PPARG1* в зависимости от половой принадлежности детей, статистически достоверные корреляционные взаимосвязи были найдены только в группе обследованных мальчиков, (табл. 6).

Таблица 6.

Корреляционная взаимосвязь экспрессии гена *PPARG1* в жировой ткани с возрастом и антропометрическими показателями.

R	Все обследованные n = 57		Мальчики n = 29	
	ВЖТ	ПЖТ	ВЖТ	ПЖТ
Возраст	0,16	0,24	0,48*	0,28
Рост	0,3[#]	0,33*	0,48*	0,41[#]
SDSpоста	0,17	0,22	-0,009	0,28
Вес	0,2	0,28[#]	0,47*	0,39[#]
ОТ	0,2	0,19	0,52*	0,4[#]
ИМТ	0,15	0,2	0,37[#]	0,3
SDСИМТ	0,03	0,09	0,14	0,19

* $p < 0,01$; # $p < 0,05$;

Анализируя особенности экспрессии гена рецептора активируемого пролифераторами пероксисом 1 и 2 типа, мы выявили, что в жировой ткани преобладает экспрессия рецептора 1-го типа, как при анализе результатов всей группы обследованных детей в целом (экспрессия *PPARG1/PPARG2* в подкожной жировой ткани $p = 0,019$; экспрессия *PPARG1/PPARG2* в висцеральной жировой ткани $p = 0,0002$), так и при разделении обследованных пациентов в зависимости от показателя SDS ИМТ, рис 3.

Корреляционный анализ взаимосвязи экспрессии генов рецепторов, активируемых пролифераторами пероксисом гамма 1 и 2 и каннабиноидного рецептора 1 типа и генов адипокинов

Экспрессия и секреция адипокинов жировой тканью сложный процесс, регулируемый множеством факторов. Одной из задач нашей работы было исследование возможной взаимосвязи экспрессии генов рецепторов PPAR γ и каннабиноидных рецепторов 1 типа и генов адипокинов.

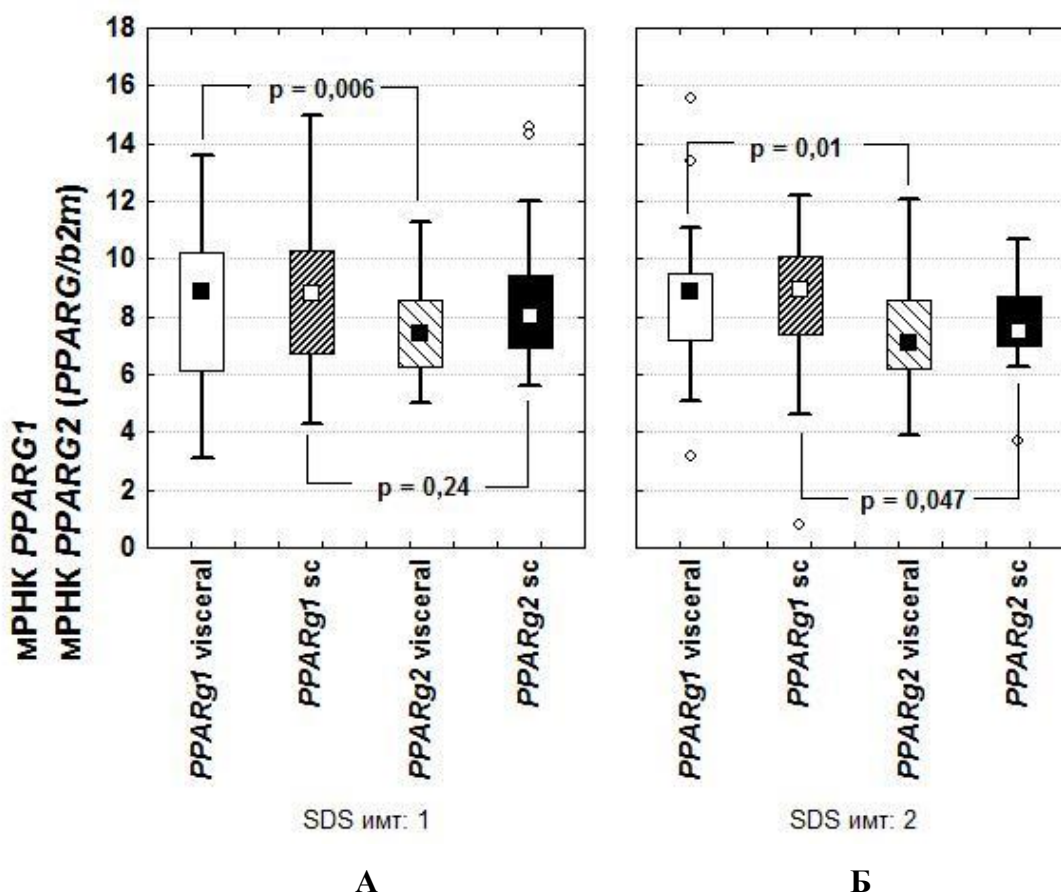


Рисунок 3. Экспрессия гена *PPARG1* и *PPARG2* в подкожной и висцеральной жировой клетчатке в группах детей с нормальным весом (А) и избытком массы тела (Б).

Известно, что рецепторы PPAR γ являются ключевыми регуляторами адипогенеза и по данным ряда исследований их активация может модулировать уровень экспрессии генов, вовлеченных в липидный и углеводный обмен. Специфические активаторы данных рецепторов, включая тиазолидиндионы (ТЗД), улучшают толерантность к глюкозе и чувствительность к инсулину у пациентов с СД2, и одним из вероятных механизмов этого феномена является PPAR γ – опосредованная активация транскрипции и секреции адипонектина. Активация PPAR γ и связывание со вторым белком, ретиноидным рецептором X (RXR) формирует гетеродимер, распознающий и

связывающийся со специфическими последовательностями ДНК – элементами PPAR ответа (PPREs), обнаруживаемыми в регуляторных регионах генов, кодирующих белки, участвующих в метаболизме липидов и глюкозы. Показано, что активация экспрессии гена *ADIPOQ* может происходить при непосредственном связывании активного комплекса PPAR γ /RXR с промотерным участком гена адипонектина [Iwaki M., 2003]. В то же время данные о регуляции экспрессии и секреции висфатина посредством активации рецепторов PPAR γ противоречивы. В исследовании Hammarstedt A. и соавт. [2005], было показано, что уровень экспрессии гена висфатина и его сывороточная концентрация не изменяется при назначении ТЗД. Однако в другой работе применение розиглитазона приводило к значимому повышению уровня висфатина сыворотки крови у обследованных пациентов и усилению секреции висфатина жировой тканью *in vitro* [Haider D.G., 2007].

По данным нашего исследования была найдена сильная позитивная корреляционная взаимосвязь экспрессии обеих изоформ гена рецептора PPAR γ с экспрессией генов адипокинов как в подкожной, так и в висцеральной жировой ткани, за исключением положительной, но статистически незначимой связи экспрессии генов висфатина и *PPARG2* в ВЖТ, (табл. 7).

Необходимо отметить, что корреляционная взаимосвязь между исследуемыми генами оставалась статистически значимой с поправкой на возраст, стадию полового развития и ИМТ обследованных пациентов ($p < 0,01$).

Таблица 7.

Корреляционная взаимосвязь экспрессии генов адипокинов и рецепторов PPAR γ 1 и 2 в жировой ткани у детей.

	<i>ADIPOQ</i>	<i>PBEF1</i>
Висцеральная жировая ткань		
<i>PPARG1</i>	R = 0,82 ($p < 0,0001$)	R = 0,54 ($p < 0,0001$)
<i>PPARG2</i>	R = 0,66 ($p < 0,0001$)	R = 0,24 ($p > 0,05$)
Подкожная жировая ткань		
<i>PPARG1</i>	R = 0,7 ($p < 0,0001$)	R = 0,42 ($p = 0,002$)
<i>PPARG2</i>	R = 0,61 ($p < 0,0001$)	R = 0,42 ($p = 0,002$)

R- коэффициент корреляции Спирмена.

В настоящее время известно, что эндоканнабиноидная система играет важную роль в регуляции эндокринной функции жировой ткани. Так, по данным нескольких исследований, активация КБ1 рецепторов снижает экспрессию адипонектина [Bellocchio L., 2008], и повышает экспрессию висфатина [Perwitz N., 2006], что вносит вклад в усиление инсулинорезистентности и снижает утилизацию глюкозы на уровне мышечной ткани и печени.

По результатам нашего исследования было выявлено, что экспрессия гена *CNR1* ассоциирована с экспрессией генов адипокинов как в висцеральной, так и в подкожной жировой ткани, (табл. 8). И так

же как в случае с рецепторами PPAR γ корреляционная взаимосвязь не нивелируется при введении в анализ поправок на возраст, стадию полового развития и показатели антропометрии (ИМТ, SDS ИМТ) ($p < 0,01$).

Таблица 8.

Корреляционная взаимосвязь экспрессии генов адипокинов и каннабиноидного рецептора 1 типа в жировой ткани у детей.

	<i>ADIPOQ</i>	<i>PBEF1</i>
Висцеральная жировая ткань		
<i>CNRI</i>	R = 0,5 ($p < 0,0001$)	R = 0,48 ($p < 0,0001$)
Подкожная жировая ткань		
<i>CNRI</i>	R = 0,63 ($p < 0,0001$)	R = 0,36 ($p = 0,006$)

R- коэффициент корреляции Спирмена.

Таким образом, учитывая полученные результаты, можно предположить, что рецепторы, активируемые пролифераторами пероксисом гамма и каннабиноидный рецептор 1 типа принимают участие в регуляции экспрессии генов адипокинов уже в детском возрасте и это может служить основанием для дальнейших исследований и поиску новых патогенетических подходов к терапии ожирения и ассоциированных с ним метаболических нарушений.

Выводы:

1. Уровень адипонектина сыворотки крови прогрессивно снижается по мере полового созревания у детей и отрицательно коррелируется с показателями ИМТ и ОТ. При ожирении у детей отмечается снижение уровня адипонектина сыворотки крови, особенно выраженное при наличии инсулинорезистентности. Уровень адипонектина коррелируется с показателями инсулина сыворотки крови и индексами инсулинорезистентности.
2. Уровень висфатина сыворотки крови не ассоциирован с показателем ИМТ у детей, но взаимосвязан с процентным содержанием жировой ткани. При ожирении, осложненном инсулинорезистентностью, уровень висфатина сыворотки статистически значимо выше, чем при неосложненном ожирении. Уровень висфатина сыворотки крови коррелируется с показателями холестерина и ХС-ЛПНП.

3. Экспрессия гена *ADIPOQ* в жировой ткани зависит от стадии полового развития, достигая пика на стадии пубертата Таннер 2 – 3 и снижаясь к стадии Таннер 4 - 5. Уровень экспрессии гена адипонектина положительно коррелируется с показателями ИМТ и ОТ. Экспрессия гена *ADIPOQ* в подкожной жировой ткани отрицательно коррелируется с уровнем адипонектина сыворотки крови.
4. Экспрессия гена висфатина - *PBEF1* - преобладает в висцеральной жировой ткани и отрицательно коррелируется со стадией пубертата. Уровень висфатина сыворотки крови не взаимосвязан с экспрессией гена *PBEF1* в жировой ткани.
5. Ген каннабиноидного рецептора - *CNR1* - экспрессируется в жировой ткани без депоспецифических отличий. Экспрессия гена *CNR1* в подкожной жировой ткани прямо коррелируется с экспрессией генов *ADIPOQ* и *PBEF1*.
6. Экспрессия гена *PPARG1* в жировой ткани преобладает над экспрессией гена *PPARG2*. Не обнаружено депоспецифических отличий экспрессии гена *PPARG1*. В группе детей с нормальным весом экспрессия гена *PPARG2* выше в подкожной жировой ткани. Экспрессия гена *PPARG* в жировой ткани взаимосвязана с экспрессией генов адипокинов - *ADIPOQ* и *PBEF1*.

Практические рекомендации:

1. Разработанная методика исследования экспрессии генов в жировой ткани может использоваться в экспериментальных и клинических исследованиях.
2. Уровень адипонектина сыворотки крови может быть использован как маркер метаболических нарушений при ожирении у детей.

Список публикаций:

1. Косыгина А.В., Васюкова О.В. Новое в патогенезе ожирения: адипокины – гормоны жировой ткани // Проблемы эндокринологии – 2009 – Т.55(1) – С.44-51.
2. Косыгина А.В., Сосунов В.В., Петеркова В.А., Дедов И.И. Экспрессия гена адипонектина (*ADIPOQ*) в подкожной и висцеральной жировой ткани и уровень адипонектина сыворотки крови у детей. // Проблемы эндокринологии – 2010 – Т.56(6) – С.3-8.
3. Косыгина А.В., Сосунов В.В., Петеркова В.А., Дедов И.И. Уровень висфатина сыворотки крови и экспрессия гена висфатина (*PBEF1*) в подкожной и висцеральной жировой ткани у детей. // Ожирение и метаболизм – 2010 - №.4(25) – С.20-23.
4. Косыгина А.В., Петеркова В.А. Уровень адипонектина в сыворотке крови и экспрессия гена адипонектина в подкожной и висцеральной жировой ткани у детей. // Сборник тезисов. Всероссийский конгресс «Современные технологии в эндокринологии» - 2009 - С.280.
5. Косыгина А.В., Васюкова О.В. Эндоканнабиноиды: новая история древней биологической системы. // Эндокринологический вестник – 2008 - №5 - С.10.
6. Косыгина А.В. Адипоцитокины в научной и клинической практике. // Ожирение и метаболизм – 2011 - № 1(26) – С. 32-39.
7. Kosygina A.V., Vasyukova O.V., Tolstov K.N., Poddubny I.V., Peterkova V.A. Expression of genes *PPARG*, *CNRI*, *ADIPOQ* and *PBEF1* in subcutaneous and visceral adipose tissue and serum level of Adiponectin in children. // Hormone research – 2009 – Vol.72 (suppl.3) - P. 287.

Список сокращений:

АЛТ – аланинаминотрансфераза

АСТ – аспаратаминотрансфераза

ВЖТ – висцеральная жировая ткань

ДГЭА-С – дегидроэпиандростендион-сульфат

ИМТ – индекс массы тела

ИРИ – иммунореактивный инсулин

КБ1 – каннабиноидный рецептор 1 типа

ОГТТ – оральная глюкозотолерантная проба

ОТ – окружность талии

ПЖТ – подкожная жировая ткань

ТГ – триглицериды

ТЗД - тиазолидиндионы

ХС-ЛПВП – липопротеиды высокой плотности

ХС-ЛПНП – липопротеиды низкой плотности

RXR – ретиноидный рецептор X

PPREs - элементы PPAR ответа (PPAR-responsive element)