

©Коллектив авторов

ОСОБЕННОСТИ ПРОДУКЦИИ ХИМЕРИНА У БОЛЬНЫХ ОЖИРЕНИЕМ С РАЗЛИЧНЫМ СОСТОЯНИЕМ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА

М.А. Василенко¹, Е.В. Кириенкова¹, Д.А. Скуратовская¹, П.А. Затолокин^{1,2},
Н.И. Миронюк², Л.С. Литвинова^{1*}

¹Балтийский федеральный университет имени И. Канта,
36041, Калининград, ул. А. Невского, 14; эл. почта: larisalitvinova@yandex.ru

²Областная клиническая больница Калининградской области, Калининград

Химерин – медиатор жировой ткани, принимающий участие в регуляции многих процессов, включая липогенез, воспалительные реакции и др. Роль химерина в развитии инсулинорезистентности изучена недостаточно. В данной работе исследовали особенности продукции химерина у больных ожирением с разным состоянием углеводного обмена. Обследовано 155 пациентов с диагнозом ожирение и 34 человека с избыточной массой тела. Контрольную группу 1 составили 43 условно здоровых донора, не имеющих ожирения. Для сопоставления результатов исследования по определению уровней тканеспецифической экспрессии мРНК генов *IL-6*, *TNF-α*, *RARRES2*, (кодирующих *IL-6*, *TNF-α* и химерин) в жировой ткани введена группа контроля 2, включающая 30 пациентов без ожирения. Исследование относительного уровня экспрессии мРНК генов *IL-6*, *TNF-α* и *RARRES2*, (кодирующих *IL-6*, *TNF-α* и химерин), проводили методом ПЦР в режиме реального времени. Концентрацию молекул *IL-6*, *TNF-α* и химерина измеряли в сыворотке/плазме крови с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). Выявлены достоверные различия плазменного уровня химерина и установлены тканеспецифические особенности экспрессии гена *RARRES2* у больных ожирением в зависимости от степени ожирения и состояния углеводного обмена. Показаны разнонаправленные ассоциации экспрессии гена *RARRES2* с генами *TNF-α* и *IL-6* в жировой ткани разной локализации: у больных ожирением (индексом массы тела ≤ 40 кг/м²) без сахарного диабета 2 типа – отрицательного, а с сахарным диабетом 2 типа – положительного характера. Выявленные взаимосвязи плазменного содержания химерина и уровня экспрессии его гена в различных биоптатах с показателями углеводного и липидного обменов, провоспалительными молекулами свидетельствуют в пользу участие химерина в метаболических и иммунных процессах при ожирении.

Ключевые слова: инсулинорезистентность, ожирение, сахарный диабет 2 типа, химерин, мРНК, ПЦР

DOI: 10.18097/PBMC20176306582

ВВЕДЕНИЕ

При ожирении жировая ткань (ЖТ) действует в качестве эндокринного и паракринного органа, который регулирует выработку адипокинов и других молекул, в частности, цитокинов, ростовых молекул и др. [1]. Согласно современным представлениям, в патогенезе инсулинорезистентности значимую роль играет воспаление жировой ткани [2]. Медиаторы *TNF-α* и *IL-6* рассматривают в качестве факторов, связывающих ожирение и инсулинорезистентность: при ожирении эти синтезированные макрофагами и адипоцитами жировой ткани регуляторные молекулы оказывают негативное влияние на чувствительность периферических тканей к инсулину. Однако следует признать, что не у всех больных ожирением развивается сахарный диабет 2 типа (СД2). В связи с этим, развитие воспаления в жировой ткани не является обязательным для формирования инсулинорезистентности.

Химерин, относительно недавно обнаруженный медиатор жировой ткани, обладает как провоспалительными, так и противовоспалительными свойствами. Выявление роли химерина в воспалительных процессах и обмене веществ могло бы существенно расширить понимание патогенеза инсулинорезистентности при ожирении. В связи с вышесказанным, вполне закономерным

является предположение, что доминирование провоспалительных или противовоспалительных эффектов химерина может оказывать влияние на состояние углеводного обмена при ожирении. Данное исследование посвящено изучению особенностей тканеспецифической продукции химерина у больных ожирением с разным состоянием углеводного обмена.

МЕТОДИКА

В исследовании приняли участие 262 человека (средний возраст $42,61 \pm 8,46$ лет). Все группы были сопоставимы по возрасту и полу. В основную группу исследования включены 155 пациентов с ожирением, а также 34 человека с избыточной массой тела (ИМТ $25-29,9$ кг/м²). Группу контроля 1 составили 43 условно здоровых донора, не имеющих ожирения (ИМТ $18,9-24,9$ кг/м²) (табл. 1). Забор крови в данной группе осуществлялся во время плановой диспансеризации в Областной клинической больнице г. Калининграда. Данная группа введена для сопоставления биохимических показателей и исследуемых анализов (*TNF-α*, *IL-6* и химерина) в плазме/сыворотке крови. Для сопоставления результатов исследования уровней тканеспецифической экспрессии мРНК генов (*TNF-α*, *IL-6*, *RARRES2*, *B2M*) в жировой ткани разной локализации была введена группа контроля 2. Эта группа состояла из 30 пациентов

с нормальным ИМТ (18,9-24,9 кг/м²) без изменения параметров углеводного и жирового обменов.

У всех пациентов, вошедших в исследование, ожирение имело алиментарно-конституциональный характер с абдоминальным типом локализации. Диагноз ожирение устанавливали после детального клинико-инструментального обследования в условиях специализированного стационара, согласно критериям, рекомендованных Всемирной организацией здравоохранения (1999-2013). Общая характеристика групп исследования представлена в таблице 1. Все участники исследования были разделены на группы в зависимости от степени ожирения (по индексу массы тела, ИМТ) и состояния углеводного обмена (наличие/отсутствие СД2). Исследование проведено согласно Хельсинской Декларации ВМА 2000 г. и протоколу Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 г., и одобрено Этическим комитетом БФУ имени И. Канга (Калининград) от 23.11.2013.

Материалом для биохимических исследований и оценки провоспалительных цитокинов (IL-6, TNF- α) служила кровь, полученная путём пункции локтевой вены, взятая утром натощак в вакуумные пробирки Vacuette ("Greiner-bio-one", Австрия) с активатором образования сгустка для получения сыворотки или ЭДТА, для получения плазмы крови. Для оценки уровня С-пептида, инсулина и химерина в плазме крови, использовали кровь, стабилизированную ЭДТА. Материалом для исследования уровней экспрессии мРНК генов *IL-6*, *TNF- α* , *RARRES2* (кодирующих IL-6, TNF- α и химерин) служили биоптаты белой жировой ткани различной локализации (большой сальник, брыжейка тонкой кишки, подкожная жировая ткань) в объёме 1,0 мл каждый, полученные в ходе выполнения лапароскопических операций. У пациентов, вошедших в группы: контроль 2, с избыточной массой тела, у пациентов с ожирением без нарушений углеводного обмена (ИМТ <40 кг/м²), а также у больных ожирением (ИМТ \leq 34,9 кг/м²) с СД2 биоптаты жировой ткани были взяты в ходе проведения плановых лапароскопических операций: паховая и бедренная грыжа (справа или слева), диафрагмальная и вентральная грыжи, нефроптоз. Больные морбидным ожирением (ИМТ \geq 40 кг/м²) с референтными показателями глюкозы и пациенты

с ожирением (ИМТ \geq 35 кг/м²) с СД2 подвергались разным видам бариатрических операций (по снижению веса) по показаниям: гастрощунтирование или продольная резекция.

Исследование биохимических показателей (оценка углеводного, жирового обменов) у пациентов проводили на автоматическом биохимическом анализаторе CA-180 Furuno ("Furuno Electric Co.", Япония). Концентрацию IL-6, TNF- α , химерина измеряли в сыворотке/плазме крови с помощью набора для иммуноферментного анализа ("Вектор-Бест", Россия; "BIO Vendor", Чехия). Выделение РНК из жировой ткани осуществляли с использованием реагента Extract RNA kit ("Евроген", Россия). Чистоту препаратов выделенной РНК определяли с помощью спектрофотометра Nanovue Plus ("GE Healthcare Bio-Sciences", США). Обратную транскрипцию образцов РНК проводили с использованием набора реагентов MMLV RT kit ("Евроген"). Для определения уровней экспрессии генов проводили количественную ПЦР в режиме реального времени с использованием реагентов qPCRmix-HS SYBR ("Евроген") на амплификаторе LightCycler 480 ("Roche", Швейцария). В качестве нормировочного гена использовали *B2m* (ген β_2 -микроглобулина) [3]. О специфичности амплификации судили по анализу кривых плавления.

При амплификации использовали следующие последовательности праймеров:

IL-6 for 5'-ccttcggtccagttgccttc-3';
rev 5'-gtggggcggctacatctttg-3';
TNF- α for 5'-ccctcaacctctcttgctcaa-3';
rev 5'-ccaggttctcgaagtgggtct-3';
RARRES2 for 5'-tgaggacccccacagctct-3';
rev 5'-aggcaccacgatctcagtg-3';
B2m for 5'-cctgccgtgtgaaccatgtg-3';
rev 5'-gctgcttacatgctcgtatccca-3'.

Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью программы IBM SPSS Statistics 20 (Statistical Package for the Social Sciences). При анализе имеющихся выборок данных использовали гипотезу нормальности распределения (Колмогорова-Смирнова). Для нормально распределённых выборок вычисляли средневыборочные характеристики: среднее арифметическое, среднее квадратичное

Таблица 1. Общая характеристика групп исследования (mean \pm SD)

Признак	Группа контроля 1 ИМТ 18,9-24,9 кг/м ²	Группа контроля 2 ИМТ 18,9-24,9 кг/м ²	Группа с ИМТ 25-29,9 кг/м ²	Группы по степени ожирения (кг/м ²)		
				I ст. ИМТ 30-34,9	II ст. ИМТ 35-39,9	III ст. ИМТ \geq 40
Количество пациентов, n	43	30	34	40	46	69
ИМТ, кг/м ²	22,6 \pm 2,35	23,3 \pm 1,65	27,7 \pm 1,83	33,1 \pm 1,79	37,7 \pm 2,33	45,7 \pm 4,42
Возраст, лет	38,2 \pm 7,78	39,9 \pm 9,30	42,2 \pm 9,91	43,0 \pm 8,64	44,0 \pm 7,57	45,3 \pm 12,55
Муж/Жен, n	13/30	14/16	13/21	18/22	22/24	20/49
СД 2 типа, n	-	-	-	12	20	31
Гипертоническая болезнь, n	-	-	1	20	42	52

отклонение, ошибка среднего. Для выборок, распределение которых отличалось от нормального, рассчитывали медиану (M), первый и третий квартили (Q1, Q3). При соответствии нормальному закону распределения признака в исследуемых выборках проверку гипотезы о равенстве средних выборочных величин проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа.

Для оценки достоверности различий между независимыми количественными выборками не имеющих нормального закона распределения применяли непараметрический критерий Крускала-Уолеса. В случае обнаружения статистически значимых различий между группами проводили попарный анализ с использованием критерия Манна-Уитни с поправкой Бонферрони. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. С целью обнаружения связи между исследуемыми показателями проводили корреляционный анализ путём вычисления коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r). Статистическую обработку данных ПЦР с детекцией продуктов в режиме реального времени осуществляли с помощью специализированной программы REST 2009 v.2.0.12. Математическая модель, используемая в данной программе, объединяет в одном расчёте нормирование по референсному гену с количественной оценкой экспрессии исследуемых генов. Различия в уровнях экспрессии между контролем и исследуемой группой были оценены по каждому гену в группах средних значений S_r на статистическую значимость по рандомизации испытаний. Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изменения углеводного обмена у больных СД2 были вполне ожидаемы: на фоне высокого уровня глюкозы повышались плазменные уровни инсулина, С-пептида и индекс НОМА-IR. У больных ожирением без нарушений углеводного обмена, несмотря на нормальный уровень глюкозы, также регистрировался рост плазменных уровней инсулина, С-пептида и индекса НОМА-IR. В процессе исследования показателей липидного обмена во всех группах больных ожирением существенных отличий относительно контроля обнаружено не было (табл. 2).

Исследование относительного уровня тканеспецифической экспрессии гена *RARRES2*, кодирующего химерин, позволило выявить, что у больных ожирением без нарушений углеводного обмена значимое повышение уровня экспрессии мРНК исследуемого гена (относительно группы контроля 2) в биоптатах жировой ткани брыжейки тонкой кишки и большого сальника регистрировалось только на стадии морбидного ожирения, а в подкожной жировой ткани этот показатель достоверно не отличался от группы контроля 2 независимо от ИМТ (рис. 1, табл. 3).

Напротив, у больных абдоминальным ожирением с СД2 (независимо от ИМТ) экспрессия гена *RARRES2* равномерно возрастала в подкожной жировой ткани,

превышая результаты группы контроля 2, в среднем, в 13,5 раз (рис. 1, табл. 3). В биоптатах брыжейки тонкой кишки этот показатель увеличивался только у больных морбидным ожирением, а в жировой ткани большого сальника – у всех пациентов этой категории по отношению к группе контроля 2. Следует отметить, что с ростом ИМТ отмечено снижение уровня экспрессии гена *RARRES2* в жировой ткани большого сальника, относительно такового в группах пациентов с меньшей степенью ожирения; при этом минимальные значения этого показателя отмечены у больных морбидным ожирением с СД2 (рис. 1). Таким образом, у больных ожирением (ИМТ > 30 кг/м²) с СД2 уровень экспрессии гена *RARRES2* в подкожной жировой ткани в 3-4 раза превышал таковой в висцеральной жировой ткани (брыжейка тонкой кишки и большого сальника).

Исследование плазменного уровня химерина позволило выявить разнонаправленные изменения у больных ожирением в зависимости от состояния углеводного обмена (табл. 2). Так, у обследуемых лиц с ожирением без СД2 независимо от ИМТ плазменная концентрация химерина равномерно превышала аналогичные значения контроля ($p = 0,002$). У больных ожирением, страдающих СД2, только при I степени ожирения плазменная концентрация данного адипокина была выше контрольных цифр, а уже при ИМТ ≥ 35 кг/м², уровень химерина в плазме был сопоставим с контролем 1.

У всех больных ожирением, независимо от состояния углеводного обмена, отмечено повышение уровня экспрессии мРНК генов провоспалительных цитокинов *IL-6* и *TNF- α* (кодирующих *IL-6* и *TNF- α*) в биоптатах висцеральной жировой ткани (большого сальника и брыжейки) пропорционально повышению ИМТ (рис. 2, рис. 3). В подкожной жировой ткани достоверный рост уровня экспрессии мРНК гена *IL-6* регистрировался у больных СД2, начиная со II степени ожирения (в 2,23 раза) и у пациентов с III степенью ожирения, независимо от состояния углеводного обмена, относительно значений группы контроля 2 (рис. 2, табл. 4). Достоверное изменение уровня экспрессии мРНК гена *TNF- α* регистрировалось у всех больных ожирением и СД2 и у больных без СД2 (≥ 35 кг/м²) в подкожной жировой ткани относительно значений группы контроля 2 (рис. 3, табл. 5). Следует отметить, что уровни экспрессии мРНК генов *TNF- α* и *IL-6* в висцеральной и подкожной жировой ткани у больных СД2 превышали аналогичные показатели группы контроля 2 и пациентов с ожирением без нарушений углеводного обмена. У всех пациентов с ИМТ ≥ 35 кг/м², независимо от состояния углеводного обмена, регистрировалось достоверное повышение сывороточного содержания *IL-6*, тогда как достоверный рост концентрации *TNF- α* в сыворотке крови регистрировался у больных с ИМТ ≥ 30 кг/м² по сравнению с контролем и значениями группы с избыточной массой тела (табл. 2). Сывороточные уровни *TNF- α* и *IL-6* были выше у больных ожирением с СД2 (с сопоставимым ИМТ) по сравнению с аналогичными значениями больных ожирением без нарушений углеводного обмена и лицами группы контроля 1 ($p < 0,05$) (табл. 2).

Таблица 2. Показатели углеводного и липидного обменов, содержание химерина, IL-6, TNF- α в плазме/сыворотке крови у пациентов с ожирением без или с сахарным диабетом 2 типа (Ме (Q1-Q3))

Показатели	Контроль 1 ИМТ 18,9-24,9 кг/м ² (n=43)	Группа с ИМТ 25-29,9 кг/м ² (n=34)	Группы по степени ожирения					
			I ст., ИМТ 30-34,9 кг/м ²		II ст., ИМТ 35-39,9 кг/м ²		III ст., ИМТ \geq 40 кг/м ²	
			Без СД 2 типа (n=28)	СД 2 типа (n=12)	Без СД 2 типа (n=26)	СД 2 типа (n=20)	Без СД 2 типа (n=38)	СД 2 типа (n=31)
Глюкоза, ммоль/л	5,09 (4,87-5,52)	5,16 (4,87-5,84) p=0,49	5,5 (5,1-6,2) p=0,001**	6,7 (6,2-7,6) p=0,002**	5,9 (5,59-6,5) p=0,001**	7,3 (6,51-8,5) p=0,033*	5,45 (4,9-6,25) p=0,001**	8,3 (7,30-9,82) p=0,002**
HbA1c, %	5,1 (5,0-5,3)	5,6 (5,5-5,8) p=0,001**	5,8 (5,6-6,0) p=0,002**	6,97 (5,8-8,2) p=0,001**	6,31 (6,0-6,6) p=0,001**	6,53 (6,3-6,7) p=0,001**	5,81 (5,6-5,9) p=0,001**	7,6 (6,6-8,8) p=0,012*
С пептид, нг/мл	0,64 (0,46-0,69)	0,88 (0,55-1,36) p=0,041*	0,92 (0,58-1,25) p=0,021*	1,1 (0,81-1,50) p=0,018*	1,58 (0,71-1,82) p=0,003**	2,39 (0,92-3,3) p=0,004**	1,09 (0,83-1,9) p=0,013*	2,35 (1,4-3,7) p=0,002**
Инсулин, мкЕд/мл	4,09 (3,8-4,7)	8,7 (5,6-16,2) p=0,007*	9,4 (4,3-17,7) p=0,003**	17,3 (12,6-32,7) p=0,003**	19,8 (12,6-32,7) p=0,001**	31,4 (24,2-38,8) p=0,001**	23,8 (21,8-30,4) p=0,001**	51,6 (29,7-59,65) p=0,001**
НОМА-IR, усл. ед.	0,9 (0,8-1,0)	2,0 (1,5-2,4) p=0,032*	2,3 (1,9-2,7) p=0,024*	4,9 (4,6-5,3) p=0,014*	7,7 (7,3-8,3) p=0,011*	11,9 (10,0-12,4) p=0,001**	7,8 (7,0-8,8) p=0,012*	16,9 (12,9-25,9) p=0,001**
ОХ, ммоль/л	4,71 (4,33-5,29)	4,50 (3,70-5,25) p=0,113	4,45 (4,11-4,88) p=0,190	4,60 (3,86-5,67) p=0,427	4,96 (4,08-5,32) p=0,865	5,03 (4,08-6,12) p=0,296	4,77 (4,14-5,33) p=0,428	4,44 (3,86-5,10) p=0,427
ЛПВП, ммоль/л	1,66 (1,39-2,05)	1,34 (1,10-1,60) p=0,023*	1,17 (0,95-1,31) p=0,001**	1,05 (0,87-1,29) p=0,001**	1,22 (1,13-1,37) p=0,010*	1,09 (0,86-1,38) p=0,001**	1,10 (0,86-1,27) p=0,001**	1,09 (0,91-1,30) p=0,001**
ЛПНП, ммоль/л	2,67 (2,22-2,9)	2,46 (1,87-2,95) p=0,271	2,70 (2,31-2,87) p=0,834	2,44 (1,64-4,18) p=0,422	2,77 (2,24-3,19) p=0,811	3,20 (2,16-3,69) p=0,083	2,87 (2,44-3,30) p=0,291	2,68 (2,12-3,21) p=0,973
ТГ, ммоль/л	0,68 (0,53-0,91)	0,89 (0,66-1,39) p=0,762	0,87 (0,76-1,76) p=0,244	0,95 (0,73-1,40) p=0,163	1,26 (0,79-1,83) p=0,005**	1,56 (0,92-2,22) p=0,002**	1,45 (1,00-2,16) p=0,001**	1,49 (0,99-2,07) p=0,002**
Химерин, нг/мл	128,0 (117,0-130,3)	116,4 (85,0-165,0) p=0,698	162,2 (115,0-168,0) p=0,048*	168,0 (135,5-186,1) p=0,039*	194,6 (149,1-195,3) p=0,021*	131,1 (130,3-170,4) p=0,134	190,1 (178,1-194,2) p=0,034*	134,4 (103,1-147,6) p=0,654
TNF- α , пг/мл	3,30 (2,70-4,55)	2,90 (2,61-3,89) p=0,732	8,79 (4,05-13,92) p=0,011*	20,04 (14,08-27,23) p=0,001**	9,66 (3,56-16,59) p=0,009*	28,28 (15,26-43,49) p=0,001**	15,06 (2,67-18,69) p=0,003**	31,22 (18,21-44,55) p=0,001**
IL-6, пг/мл	1,35 (0,55-1,95)	1,29 (0,48-2,03)	1,45 (0,60-3,22)	1,49 (0,58-2,60)	2,54 (1,47-3,36) p=0,038*	4,90 (3,74-6,55) p=0,001**	2,63 (1,30-4,75) p=0,024*	5,32 (4,41-7,87) p=0,001**

Примечание: ОХ - общий холестерин, ЛПВП - липопротеины высокой плотности, ЛПНП - липопротеины низкой плотности, ТГ - триглицериды; * p<0,05, ** - p<0,004 определена относительно контроля, при помощи непараметрического критерия Манна-Уитни с поправкой Бонферрони для двух независимых выборок.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Химерин – адипокин [4], механизм действия которого до конца не изучен. Этот белок, кодируемый геном *RARRES2*, секретируется в виде прохимерина с низкой биологической активностью [5]. Большая часть циркулирующего химерина находится в форме неактивного прохимерина (18 кДа), для активации которого необходим внеклеточный процессинг [4].

Выявлена зависимость функций химерина от его изоформы: химерин 21-157 отвечает за хемотаксис на начальных этапах воспаления, тогда как химерин 21-154 проявляет противовоспалительные свойства, ингибируя активацию макрофагов [5]. Адипокин реализует свои эффекты за счёт связывания с 3 рецепторами: CMKLR1 или Chem23, GPR1 и CCRL2 [4]. Учитывая наличие рецепторов к химерину в жировой, мышечной и печеночной тканях, а также

ОСОБЕННОСТИ ПРОДУКЦИИ ХИМЕРИНА У БОЛЬНЫХ ОЖИРЕНИЕМ

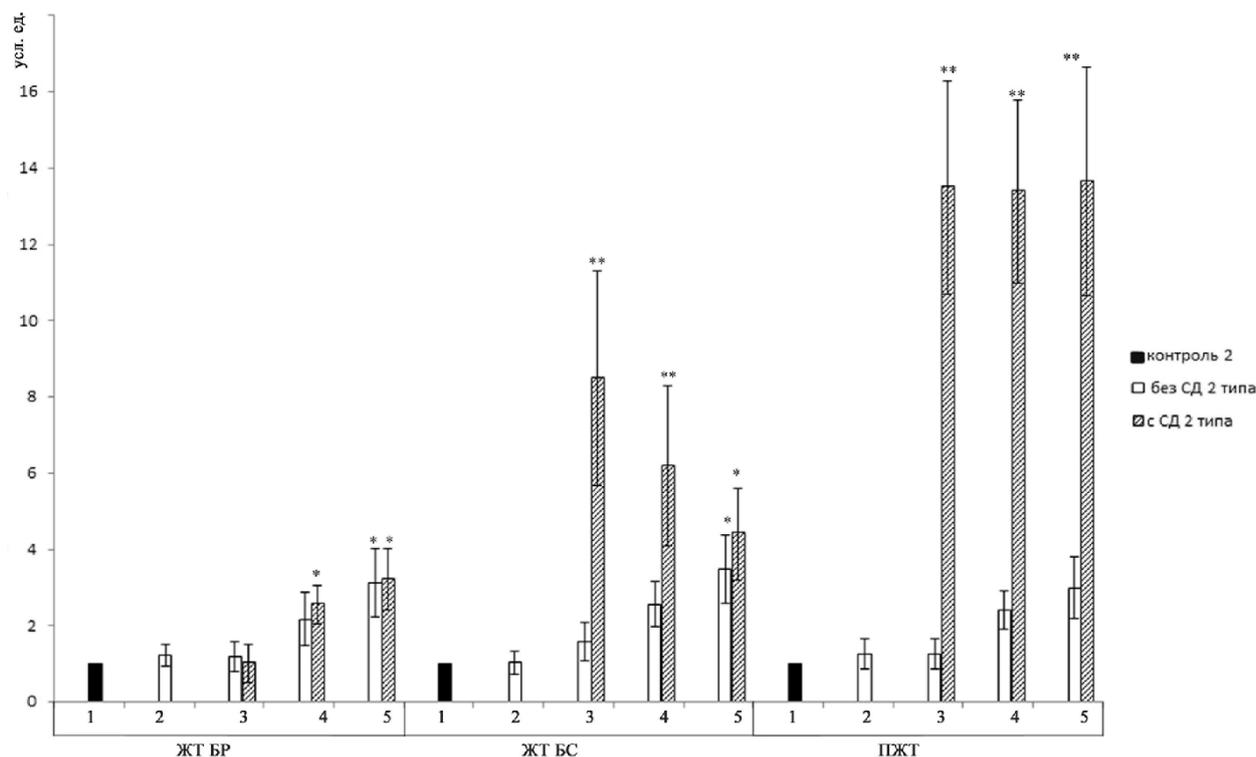


Рисунок 1. Изменение относительного уровня экспрессии гена *RARRES2* (кодирующего химерин) в жировой ткани разной локализации у пациентов с ожирением, ассоциированным с сахарным диабетом 2 типа и без него. Экспрессия гена (mean±SD) определялась количественно путём нормализации к эталонному гену β_2 -микроглобулин относительно группы контроля 2 (n=30), * - p<0,05, ** - p<0,001. 1- группа контроля 2 (ИМТ 18,9-24,9 кг/м²); 2 - с избыточной массой тела (ИМТ 25-29,9 кг/м²); 3 - с I ст. ожирения (ИМТ 30-34,9 кг/м²); 4 - с II ст. ожирения (ИМТ 35-39,9 кг/м²); 5 - с III ст. ожирения (ИМТ ≥40 кг/м²); ЖТ БР - жировая ткань брыжейки, ЖТ БС - жировая ткань большого сальника, ПЖТ - подкожная жировая ткань.

Таблица 3. Относительный уровень экспрессии гена *RARRES2* (кодирующего химерин) в жировой ткани разной локализации у больных ожирением с СД 2 типа и без него

Показатели	Группа с ИМТ 25-29,9 кг/м ² (n=34)	Группы по степени ожирения					
		I ст., ИМТ 30-34,9 кг/м ²		II ст., ИМТ 35-39,9 кг/м ²		III ст., ИМТ ≥ 40 кг/м ²	
		Без СД 2 типа (n=28)	СД 2 типа (n=12)	Без СД 2 типа (n=26)	СД 2 типа (n=20)	Без СД 2 типа (n=38)	СД 2 типа (n=31)
Брыжейка, усл. ед.	1,22±0,3 p=0,59	1,19±0,4 p=0,53	1,01±0,5 p=0,97	2,01±0,7 p=0,12	2,55±0,5 p=0,02*	3,12±0,9 p=0,03*	3,22±0,8 p=0,01*
Большой сальник, усл. ед.	1,04±0,3 p=0,94	1,59±0,5 p=0,37	8,49±2,8 p=0,001**	2,56±0,6 p=0,10	6,19±2,1 p=0,001**	3,49±0,9 p=0,04*	4,41±1,2 p=0,02*
Подкожная жировая ткань, усл. ед.	1,25±0,4 p=0,80	1,27±0,4 p=0,69	13,50±2,8 p=0,001*	2,4±0,5 p=0,57	13,38±2,4 p=0,001**	3,0±0,8 p=0,17	13,64±3,0 p=0,001**

Примечание. Здесь и в таблицах 4 и 5 экспрессия гена (mean±SD) определялась количественно путём нормализации к эталонному гену β_2 -микроглобулин относительно группы контроля 2 (n=30), * - p<0,05, ** - p<0,001

на иммунных клетках, данный адипокин выполняет мультифункциональную роль, регулируя иммунный ответ, воспалительный фон и метаболические процессы в организме [6].

Нами не было обнаружено статистически значимых возрастных и гендерных отличий плазменного уровня химерина в исследуемых группах, что согласуется с данными других исследователей [7], тогда как в некоторых работах обнаружен более высокий уровень у женщин [8], у мужчин [9].

Проведённое нами исследование позволило выявить разнонаправленные изменения плазменного уровня химерина у больных ожирением в зависимости от состояния углеводного обмена. Данные сравнительного анализа показали более высокие значения плазменного содержания химерина у больных абдоминальным ожирением (≥35 кг/м²) без СД2 по сравнению с больными СД2 (с сопоставимым ИМТ) (табл. 2). Выявленные нами изменения согласуются с данными литературы. Shin и соавторы показали,

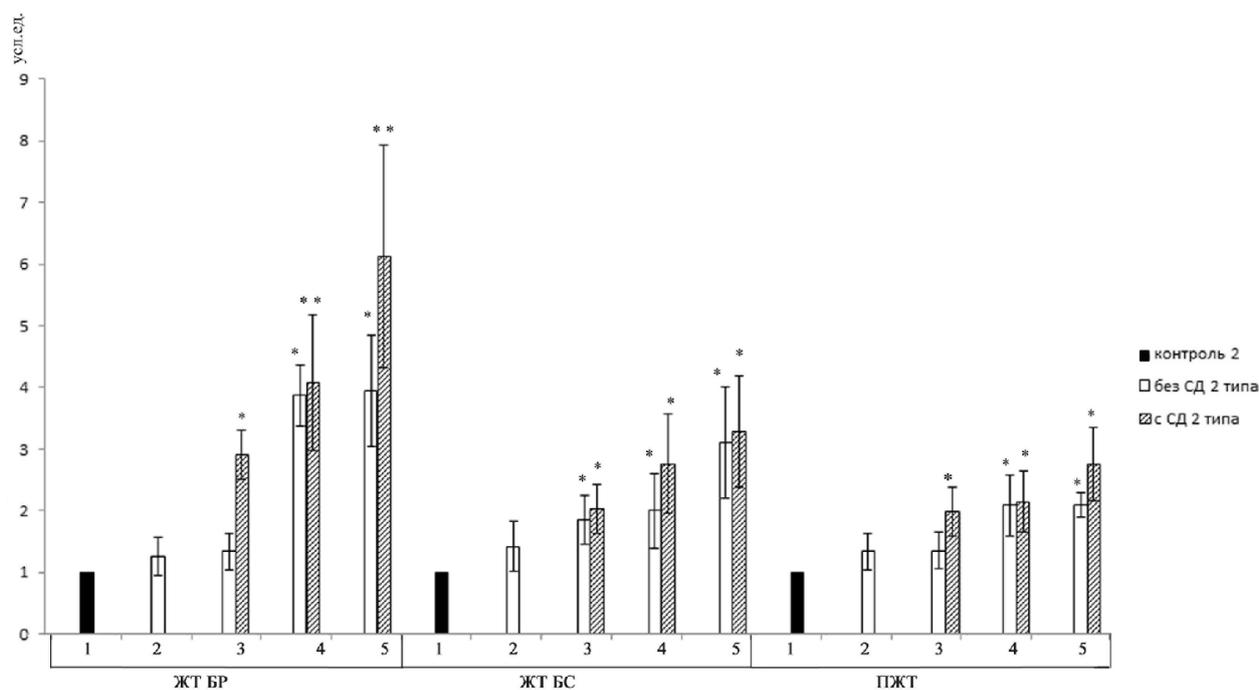


Рисунок 2. Изменение относительного уровня экспрессии гена *IL-6* (кодирующего *IL-6*) в жировой ткани разной локализации у пациентов с ожирением, ассоциированным с сахарным диабетом 2 типа и без него. Обозначения как на рисунке 1.

Таблица 4. Относительный уровень экспрессии гена *IL-6* (кодирующего *IL-6*) в жировой ткани разной локализации у больных ожирением с СД 2 типа и без него

Показатели	Группа с ИМТ 25-29,9 кг/м ² (n=34)	Группы по степени ожирения					
		I ст., ИМТ 30-34,9 кг/м ²		II ст., ИМТ 35-39,9 кг/м ²		III ст., ИМТ ≥40 кг/м ²	
		Без СД 2 типа (n=28)	СД 2 типа (n=12)	Без СД 2 типа (n=26)	СД 2 типа (n=20)	Без СД 2 типа (n=38)	СД 2 типа (n=31)
Брыжейка, усл. ед.	2,23±0,4 p=0,61	2,70±0,5 p=0,05	2,54±0,4 p=0,03*	3,34±0,5 p=0,01*	3,78±0,8 p=0,004**	5,89±1,1 p=0,001**	6,70±1,4 p=0,001**
Большой сальник, усл. ед.	2,12±0,5 p=0,66	3,26±0,4 p=0,05	3,27±0,5 p=0,02*	4,67±0,8 p=0,003*	6,06±1,7 p=0,001**	5,23±0,9 p=0,001**	7,23±1,4 p=0,001**
Подкожная жировая ткань, усл. ед.	1,12±0,3 p=0,92	1,10±0,3 p=0,85	1,68±0,3 p=0,59	1,78±0,4 p=0,62	2,23±0,5 p=0,02*	1,95±0,4 p=0,04*	2,25±0,5 p=0,02*

что уровень этого адипокина в значительной степени связан с накоплением висцерального жира у больных ожирением без диабета [10].

У больных ожирением без СД2 были выявлены ассоциации плазменного содержания химерина с уровнем экспрессии мРНК его гена в жировой ткани брыжейки тонкой кишки и подкожной жировой ткани; у больных абдоминальным ожирением с СД2 (<40 кг/м²) плазменный уровень химерина положительно коррелировал с уровнем экспрессии мРНК гена *RARRES2* в висцеральной жировой ткани (брыжейка тонкой кишки и большой сальник), а при морбидном ожирении (ИМТ ≥40 кг/м²) – зависел от экспрессии гена *RARRES2* в жировой ткани брыжейки тонкой кишки.

Интересно, что у больных ожирением (II степень), независимо от состояния углеводного обмена, выявлены положительные взаимосвязи между

экспрессией гена *RARRES2* в биоптатах жировой ткани брыжейки тонкой кишки с таковой в подкожной (r=0,48 p<0,05 без СД2; r=0,68 СД2, p<0,05), тогда как у больных морбидным ожирением с СД2 обнаружены отрицательные связи между уровнем экспрессией гена *RARRES2* в биоптатах подкожной жировой ткани и большого сальника (r=-0,76, p<0,01). Кроме того, выявленная нами отрицательная взаимосвязь между циркулирующим химерином и уровнем экспрессии гена *RARRES2* в жировой ткани большого сальника у больных ожирением (III ст., ИМТ ≥35 кг/м²) с СД2 (r=-0,82, p<0,01) может быть следствием запуска механизма обратной связи: высокие уровни химерина в крови подавляют экспрессию гена *RARRES2* в жировой ткани большого сальника.

Выявленное нами снижение экспрессии гена *RARRES2* в биоптатах в жировой ткани большого сальника больных ожирением (ИМТ ≥35 кг/м²) с СД2

ОСОБЕННОСТИ ПРОДУКЦИИ ХИМЕРИНА У БОЛЬНЫХ ОЖИРЕНИЕМ

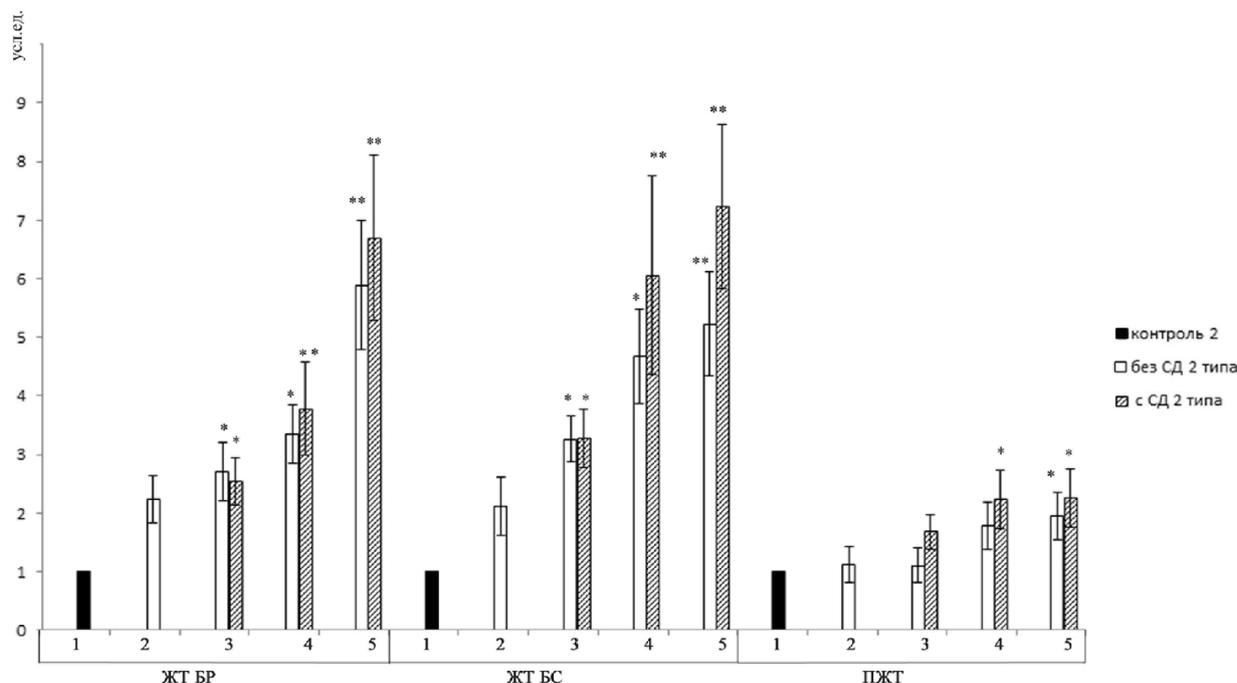


Рисунок 3. Изменение относительного уровня экспрессии гена TNF-α (кодирующего TNF-α) в жировой ткани разной локализации у пациентов с ожирением, ассоциированным с сахарным диабетом 2 типа и без него. Обозначения как на рисунке 1.

Таблица 5. Относительный уровень экспрессии гена TNF-α (кодирующего TNF-α) в жировой ткани разной локализации у больных ожирением с СД 2 типа и без него

Показатели	Группа с ИМТ 25-29,9 кг/м ² (n=34)	Группы по степени ожирения					
		I ст., ИМТ 30-34,9 кг/м ²		II ст., ИМТ 35-39,9 кг/м ²		III ст., ИМТ ≥40 кг/м ²	
		Без СД 2 типа (n=28)	СД 2 типа (n=12)	Без СД 2 типа (n=26)	СД 2 типа (n=20)	Без СД 2 типа (n=38)	СД 2 типа (n=31)
Брыжейка, усл. ед.	1,26±0,3 p=0,59	1,34±0,3 p=0,61	2,91±0,4 p=0,04*	3,87±0,5 p=0,01*	4,07±1,1 p=0,001**	3,95±0,8 p=0,02*	6,12±1,8 p=0,001**
Большой сальник, усл. ед.	1,42±0,4 p=0,61	1,85±0,4 p=0,25	2,03±0,4 p=0,02*	2,00±0,6 p=0,04*	2,77±0,8 p=0,02*	3,10±0,9 p=0,04*	3,28±0,9 p=0,04*
Подкожная жировая ткань, усл. ед.	1,34±0,3 p=0,68	1,35±0,3 p=0,87	1,98±0,4 p=0,04*	2,09±0,5 p=0,03*	2,15±0,5 p=0,01*	2,10±0,24 p=0,01*	2,76±0,6 p=0,03*

(рис. 1, табл. 3), коррелирующее с повышением ИМТ ($r=-0,56$, $p<0,01$), вероятно, указывает на нарушение функционирования адипоцитов, обусловленное их чрезмерной гипертрофией; тогда как снижение экспрессии гена *RARRES2*, кодирующего химерин, может препятствовать дифференцировке преадипоцитов в зрелые адипоциты [11].

В литературе встречаются данные о зависимости циркулирующих уровней химерина с экспрессией гена *RARRES2* в висцеральной жировой ткани у пациентов с ожирением, отягощённым СД2 [7]. На модели экспериментальных животных с ожирением без диабета также было выявлено, что экспрессия гена химерина значительно выше в висцеральной жировой ткани при сравнении с подкожной [12]. Другие учёные, напротив, установили, что концентрация химерина в сыворотке крови отрицательно коррелирует с экспрессией

мРНК *RARRES2* в подкожной и висцеральной жировой ткани [13]. В то же время, Sledzinski и соавторы продемонстрировали, что повышенное содержание циркулирующего химерина у пациентов с ожирением без СД2 коррелирует с ИМТ, тогда как для уровней мРНК *RARRES2* таких зависимостей не выявлено [14].

Резюмируя вышесказанное, обнаруженный нами высокий уровень экспрессии гена *RARRES2* в биоптатах подкожной жировой ткани и брыжейки тонкой кишки у больных ожирением (ИМТ ≥ 35 кг/м²) с СД2 на фоне значений плазменной концентрации химерина, сопоставимых с контролем, может свидетельствовать о его, преимущественно, пара- и аутокринном механизмах действия, реализуемом в пределах жировой ткани, тогда как в формировании плазменного содержания этого адипокина принимает участие жировая ткань большого

сальника. Обнаруженные нами разнонаправленные корреляционные взаимосвязи могут указывать на различную роль химерина подкожного и висцерального депо жировой ткани.

Установлена роль химерина в регуляции экспрессии генов, участвующих в липидном обмене адипоцитов и метаболизме глюкозы, ангиогенезе, процессах пролиферации и дифференцировки адипоцитов [15]. Подтверждением высказанного являются, выявленные положительные взаимосвязи между плазменным уровнем химерина с триглицеридами ($r=0,91$, $p<0,01$) и гликированным гемоглобином ($r=0,91$, $p<0,05$) в группе обследованных нами больных абдоминальным ожирением (с ИМТ <40 кг/м²) с СД2. Выявлено, что химерин ингибирует фосфорилирование киназа-3-гликогенсинтазы (GSK3) – фермента, необходимого для синтеза и хранения гликогена, приводя к нарушению усвоения глюкозы и повышению её плазменного уровня [16]. Следует отметить, что у больных ожирением (<40 кг/м²) без СД2, уровень экспрессии гена *RARRES2* жировой ткани брыжейки тонкой кишки был отрицательно связан с глюкозой ($r=-0,66$, $p<0,05$) и индексом НОМА-IR ($r=-0,67$, $p<0,05$). Согласно данным Takahashi и соавторов, гиперпродукция химерина может компенсировать гипергликемию за счёт увеличения инсулин-зависимого поглощения глюкозы адипоцитами [17].

Связываясь с рецептором ChemR23, химерин влияет на продукцию провоспалительных медиаторов (TNF- α , IL-1 β , IL-6), что приводит к активации MAPK пути [18], и, как следствие, происходит подавление передачи инсулинового сигнала в клетках скелетной мускулатуры человека [19]. Нами показано, что у больных ожирением (ИМТ <40 кг/м²) с СД2 уровень экспрессии гена *RARRES2* в жировой ткани брыжейки тонкой кишки и большого сальника положительно коррелировал с уровнем экспрессии TNF- α (там же) ($r=0,65$, $p<0,05$; $r=0,69$ $p<0,05$); *RARRES2* в подкожной жировой ткани – с уровнем экспрессии мРНК генов TNF- α (жировой ткани брыжейки тонкой кишки и большого сальника) ($r=0,76$, $p<0,05$; $r=0,68$, $p<0,05$); *RARRES2* жировой ткани большого сальника и IL-6 брыжейки тонкой кишки ($r=0,66$, $p<0,05$). Кроме того, у больных морбидным ожирением (ИМТ >40 кг/м²) без СД2, плазменный уровень химерина положительно коррелировал с TNF- α ($r=0,82$, $p<0,05$). Выявленные нами зависимости частично находят своё отражение в результатах других авторов [20]. Более того, результаты некоторых исследований свидетельствуют в пользу того, что повышение системного уровня химерина при СД2 в большей степени связано с воспалением, а не с ожирением [21].

TNF- α также может влиять на продукцию химерина. Так, с использованием клеточной линии 3T3-L1 Parlee и соавторы продемонстрировали, что TNF- α увеличивал синтез мРНК химерина в дифференцированных адипоцитах линии 3T3-L1, не оказывая подобного влияния на гепатоциты [22]. Группой канадских ученых установлена TNF- α -зависимая продукция активных форм

химерина адипоцитами, опосредованная действием протеаз (эластазы и триптазы) [23].

Относительно недавно в научной литературе появились данные о противовоспалительных эффектах химерина. Выявлено, что химерин предотвращает TNF/TNFA-индуцированную экспрессию vCAM-1 и адгезию моноцитов на эндотелиальных клетках сосудов, подавляя активацию путей NF- κ B и CRK/p38 и, напротив, опосредуя стимуляцию AKT1/NOS3 сигнализации [24].

В результате проведенного нами исследования показано, что у пациентов с ожирением (≤ 40 кг/м²) без СД2 имели место отрицательные корреляции между уровнем экспрессии *RARRES2* в жировой ткани большого сальника с уровнем экспрессии гена IL-6 (там же) ($r=-0,69$, $p<0,05$), а также между уровнями экспрессии *RARRES2* в подкожной с TNF- α (жировой ткани брыжейки тонкой кишки) ($r=-0,763$, $p<0,05$). Плазменный уровень химерина отрицательно коррелировал с провоспалительным медиатором TNF- α ($r=-0,94$, $p<0,05$). Данные корреляционные зависимости могут указывать на противовоспалительные свойства химерина у пациентов без нарушений углеводного обмена. Cash и соавторы показали, что активация химерина может ингибировать воспалительную реакцию путём снижения агрегации нейтрофилов и моноцитов или за счёт подавления экспрессии провоспалительных медиаторов [25].

В целом, нами установлены тканеспецифические особенности продукции химерина у больных ожирением с разным состоянием углеводного обмена. Взаимосвязи показателей, характеризующих продукцию химерина с анализом углеводного и липидного обменов, а также провоспалительными медиаторами, указывают на участие химерина в метаболических и иммунных процессах при ожирении. Мы предполагаем, что у пациентов без СД2 из про-химерина генерируется изоформа, преимущественно, с противовоспалительной активностью, тогда как при ожирении с СД2 изоформа с провоспалительным действием.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена в рамках программы повышения конкурентоспособности (“дорожной карты”) и субсидии “Организация проведения научных исследований 20.4986.2017/6.7” Балтийского федерального университета им. И. Канта.

ЛИТЕРАТУРА

1. Jung U.J., Choi M.S. (2014) Int. J. Mol. Sci., **15**, 6184-6223.
2. Blüher M. (2016) Clin. Sci. (Lond.), **130**, 1603-1614.
3. Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paep A., Speleman F. (2002) Genome Biol., **3**(7), research0034.1- research0034.11.
4. Zylla S., Pietzner M., Kühn J.P., Völzke H., Dörr M., Nauck M., Friedrich N. (2017) Obesity (Silver Spring), **25**, 468-475.

ОСОБЕННОСТИ ПРОДУКЦИИ ХИМЕРИНА У БОЛЬНЫХ ОЖИРЕНИЕМ

- Du X.Y., Leung L.L. (2009) Acta Biochim. Biophys. Sin., **41**, 973-979.
- İnci S., Aksan G., Doğan P. (2016) Ther. Adv. Endocrinol. Metab., **7**(2), 57-68.
- Chakaroun R.I., Raschpichler M., Klötting N., Oberbach A., Flehmig G., Kern M., Schön M.R., Shang E., Lohmann T., Dreßler M., Fasshauer M., Stumvoll M., Blüher M. (2012) Metabolism, **61**, 706-714.
- Gu P., Jiang W., Lu B., Shi Z. (2014) Clin. Exp. Hypertens., **36**, 326-332.
- Takahashi M., Inomata S., Okimura Y., Iguchi G., Fukuoka H., Miyake K., Koga D., Akamatsu S., Kasuga M., Takahashi Y. (2013) Endocr. J., **60**, 37-44.
- Shin H.Y., Lee D.C., Chu S.H., Jeon J.Y., Lee M.K., Im J.A., Lee J.W. (2012) Clin. Endocrinol., **77**, 47-50.
- Muruganandan S., Roman A.A., Sinal C.J. (2010) J. Bone Miner Res., **25**, 222-234.
- Goralski K.B., McCarthy T.C., Hanniman E.A., Zabel B.A., Butcher E.C., Parlee S.D., Muruganandan S., Sinal C.J. (2007) J. Biol. Chem., **282**, 28175-28188.
- Alfadda A.A., Sallam R.M., Chishti M.A., Moustafa A.S., Fatma S., Alomaim W.S., Al-Naami M.Y., Bassas A.F., Chrousos G.P., Jo H. (2012) Mol. Cells, **33**, 591-596.
- Sledzinski T., Korczynska J., Hallmann A., Kaska L., Proczko-Markuszczyńska M., Stefaniak T., Sledzinski M., Swierczynski J. (2013) J. Endocrinol. Invest., **36**, 428-434.
- Laudes M. (2011) J. Mol. Endocrinol., **46**, 65-72.
- Tarek M.A., Al Hadidi K. (2013) BJBAS, **2**, 86-95.
- Takahashi M., Takahashi Y., Takahashi K., Zolotaryov F.N., Hong K.S., Kitazawa R., Iida K., Okimura Y., Kaji H., Kitazawa S., Kasuga M., Chihara K. (2008) FEBS Lett., **582**, 573-578.
- Kaur J., Adya R., Tan B.K., Chen J., Randeve H.S. (2010) Biochem. Biophys. Res. Commun., **391**, 1762-1768.
- Neves K.B., Nguyen Dinh Cat A., Lopes R.A., Rios F.J., Anagnostopoulou A., Lobato N.S., de Oliveira A.M., Tostes R.C., Montezano A.C., Touyz R.M. (2015) Hypertension, **66**, 657-666.
- Pfau D., Bachmann A., Lössner U., Kratzsch J., Blüher M., Stumvoll M., Fasshauer M. (2010) Diabetes Care, **33**, 171-173.
- Weigert J., Neumeier M., Wanninger J., Filarsky M., Bauer S., Wiest R., Farkas S., Scherer M.N., Schäffler A., Aslanidis C., Schölmerich J., Buechler C. (2010) Clin. Endocrinol. (Oxf.), **72**, 342-348.
- Parlee S.D., Ernst M.C., Muruganandan S., Sinal C.J., Goralski K.B. (2010) Endocrinology, **151**, 2590-2602.
- Parlee S.D., McNeil J.O., Muruganandan S., Sinal C.J., Goralski K.B. (2012) PLoS One, **7**(12), e51072. DOI: 10.1371/journal.pone.0051072.
- Xie Q., Deng Y., Huang C., Liu P., Yang Y., Shen W., Gao P. (2015) J Cell Mol. Med., **19**, 986-995.
- Cash J.L., Hart R., Russ A., Dixon J.P., Colledge W.H., Doran J., Hendrick A.G., Carlton M.B., Greaves D.R. (2008) J. Exp. Med. **205**, 767-775.

Поступила: 27. 03. 2017.
Принята к печати: 17. 10. 2017.

THE CHEMERIN PRODUCTION CHANGES IN OBESE PATIENTS WITH DIFFERENT CARBOHYDRATE METABOLISM STATE

M.A. Vasilenko¹, E.V. Kirienkova¹, D.A. Skuratovskaya¹, P.A. Zatulokin^{1,2}, N.I. Mironyuk², L.S. Litvinova¹

¹Immanuel Kant Baltic Federal University,

14 Alexander Nevsky str., Kaliningrad, 36041 Russia; e-mail: arisalitvinova@yandex.ru

²Regional Clinical Hospital of the Kaliningrad Region, 74 Klinicheskaya str., Kaliningrad, 236016 Russia

Chemerin is a mediator of adipose tissue involved in the regulation of many processes, including lipogenesis, and inflammatory response. The role of chemerin in the development of insulin resistance has been insufficiently studied and needs detailed understanding. The aim of the study was to investigate chemerin production in obese patients with different states of carbohydrate metabolism. The study included 155 patients with a diagnosis of obesity; 34 patients with overweight. The control group 1 consisted of 43 conditionally healthy donors who did not have obesity. For comparison of the results of a study to determine the levels of tissue-specific mRNA expression of the genes *IL-6*, *TNF- α* , *RARRES2*, (encoding *IL-6*, *TNF- α* and chemerin) in adipose tissue introduced a control group 2 – 30 patients without obesity. Study on the relative level of mRNA expression of the genes *IL-6*, *TNF- α* and *RARRES2* (encoding *IL-6*, *TNF- α* and chemerin) was carried out using real time PCR. Concentrations of *IL-6*, *TNF- α* , and chemerin were measured in serum/plasma using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). We found significant differences in the plasma level of chemerin and tissue-specific features of *RARRES2* gene expression in obese patients, depending on the degree of obesity and the state of carbohydrate metabolism. Multidirectional associations of *RARRES2* gene expression with *TNF- α* and *IL-6* genes in adipose tissues of different localization are shown: in obese patients (BMI ≤ 40 kg/m²) without type 2 diabetes – negative, and type 2 diabetes – positive. Identified relationship chemerin plasma content and the expression level of its gene in biopsies with various parameters of carbohydrate and lipid metabolism, proinflammatory molecules indicate chemerin involved in metabolic and immune processes in obesity.

Key words: insulin resistance, obesity, type 2 diabetes mellitus, chemerin, mRNA, PCR