

Уровень висфатина сыворотки крови и экспрессия гена висфатина (*PBEF1*) в подкожной и висцеральной жировой ткани у детей

А.В. Косыгина¹, В.В. Сосунов², В.А. Петеркова¹, И.И. Дедев¹

¹ФГУ «Эндокринологический научный центр» Минздравсоцразвития России, Москва
(директор – академик РАН и РАМН И.И. Дедев)

²ООО «ДНК-синтез», Москва

Резюме. Целью проведенной работы являлось исследование особенностей экспрессии гена висфатина – *PBEF1* – в подкожной и висцеральной жировой ткани и содержания висфатина в сыворотке крови у детей, а также выявление взаимосвязи между изучаемыми факторами и основными антропометрическими показателями. Обследованы 52 пациента (27 мальчиков (52%), 25 девочек (48%) в возрасте от 2,5 до 18 лет (13,8 [7,4–15,1] лет)), подвергшихся плановым оперативным вмешательствам. Проводилось определение экспрессии гена *PBEF1* в парных образцах жировой ткани методом ПЦР в «реальном времени», определение уровня висфатина сыворотки крови. По данным нашего исследования, сывороточная концентрация висфатина в группе детей с нормальной массой тела составила 9,2 [7,4–11,6] нг/мл, а в группе с избыточной массой тела – 9,5 [7,5–11,1] нг/мл ($p=0,5$). Не выявлено статистически значимых различий содержания висфатина в зависимости от пола обследованных детей. Не было обнаружено корреляционных взаимосвязей между сывороточным содержанием висфатина, возрастом и основными антропометрическими показателями. Выявлено преобладание экспрессии гена *PBEF1* в висцеральной жировой ткани ($p=0,002$) в группе всех обследованных детей и группе детей с нормальной массой тела, в то время как у детей с избыточной массой тела ген висфатина экспрессировался без значимых депо-специфических отличий. Проведенное исследование не выявило зависимости экспрессии гена от возраста и пола обследованных детей. Экспрессия гена *PBEF1* в жировой ткани снижается по мере полового созревания ($PBEF1_{ВЖТ}\gamma=-0,24$, $p=0,02$; $PBEF1_{ПЖТ}\gamma=-0,25$, $p=0,02$). Содержание висфатина в сыворотке крови не взаимосвязано с уровнем экспрессии гена *PBEF1* в жировой ткани ($R=-0,06$, $p=0,6$). **Ключевые слова:** висфатин, жировая ткань, экспрессия генов, дети, подростки.

Resume. The aim of this study was to investigate the characteristics of visfatin – *PBEF1* – gene expression in subcutaneous and visceral adipose tissue and serum levels of visfatin in children with relation to age and anthropometric parameters. The study included 52 patients (27 boys (52%), 25 girls (48%) aged from 2,5 to 18 years (13,8 [7,4–15,1] years)), who underwent an elective surgical intervention. *PBEF1* mRNA level was measured by real-time PCR and serum level of visfatin was quantified by immunoenzyme assay. According to our study visfatin serum concentration in children with normal body weight was 9,2 [7,4–11,6] ng/ml, whereas in the overweight group – 9,5 [7,5–11,1] ng/ml ($p=0,5$). No statistically significant gender difference in serum visfatin levels was observed. No correlation between visfatin levels and age, pubertal stages and anthropometric indices in children was found. Statistically significant differences in the level of gene expression between subcutaneous and visceral adipose tissue were found ($p=0,002$) in the total group of children surveyed and children with normal weight, while there were no depot-specific differences in overweight children. The study did not reveal any dependence of *PBEF1* expression on age and sex of children. Expression of *PBEF1* in adipose tissue decreases with puberty ($PBEF1_{VAT}\gamma=-0,24$, $p=0,02$; $PBEF1_{SAT}\gamma=-0,25$, $p=0,02$). *PBEF1* expression in adipose tissue was not correlated with the serum visfatin ($R=-0,06$, $p=0,6$). **Key words:** visfatin, adipose tissue, gene expression, children, adolescents.

Введение

Висфатин был выделен в 2004 г. группой японских исследователей как гормон, который продуцируется преимущественно висцеральной жировой тканью и обладает инсулиномиметическими свойствами [4]. Целью этого исследования была идентификация новых адипоцитокинов именно висцеральной жировой ткани, с которой связано развитие метаболического синдрома. Fukuhara A. с соавт. обнаружили, что ранее идентифицированный фактор роста предшественников В-лимфоцитов – *PBEF* (pre-B cell colony-enhancing factor), синтезируемый в костном мозге, печени и скелетных мышцах, высоко экспрессируется в висцеральной жировой ткани и обладает инсулиномиметическими свойствами [9].

Это вещество получило название висфатин. Висфатин – 52-кДа белок с кристаллической структурой [5, 12], циркулирующий в кровотоке в виде мономерных и димерных форм и обладающий свойствами цитокина и фермента, участвующего в биосинтезе никотинамид-аденин-динуклеотида (НАД), вследствие чего еще одно из названий этого вещества – никотинамид-фосфорибозил-трансфераза (Nampt) [7, 8]. Концентрации висфатина в плазме относительно невысоки (нг/мл), и по отношению к циркулирующему инсулину составляют около 3–10% [10]. На сегодняшний день нет единого представления о физиологической и патофизиологической роли висфатина, однако данные последних исследований позволяют предположить вовлеченность этого адипокина в патогенез

Таблица 1

Характеристика обследованных пациентов				
	Все n=52	Нормальный вес n=35	Избыток веса n=17	p*
Возраст, годы	13,8 [7,4–15,1]	10,8 [5,6–14,3]	14 [13,8–15,1]	0,02
Пол, м/ж	27/25 (52/48%)	18/17 (51/49%)	9/8 (53/47%)	>0,05
Половое развитие				
Таннер 1 (I)	18 (35%)	17 (49%)	1 (6%)	0,01
Таннер 2–3 (II)	25 (48%)	13 (37%)	12 (71%)	
Таннер 4–5 (III)	9 (17%)	5 (14%)	4 (23%)	
SDS роста	0,49 [-0,35–1,1]	0,52 [-0,39–1,14]	0,46 [0,04–0,98]	>0,05
ОТ, см	70 [56–79]	60 [50–70]	85 [80–92]	<0,01
ИМТ	20,8 [16,3–24,1]	17,9 [15,4–20,9]	26,2 [24,4–27,3]	<0,01
SDS имт	0,68 [-0,13–1,53]	0,29 [-0,45–0,72]	1,92 [1,6–2,4]	<0,01

Примечание: данные представлены в виде медианы и [25–75%]. развития связанных с ожирением метаболических нарушений. Количество работ, посвященных исследованию клинической значимости этого адипокина у детей, ограничено.

Материалы и методы

В исследование было включено 52 ребенка в возрасте от 2,5 до 18 лет (27/25 – мальчики/девочки), подвергшихся плановым оперативным лапароскопическим вмешательствам (герниотомия, холецистэктомия, 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 анализе крови и анализе мочи.

Антропометрические измерения включали: измерение роста, веса, окружности талии (ОТ). Обработка антропометрических данных проводилась с учетом пола и возраста пациента и оценивалась в стандартных отклонениях (SDS — standard deviation score) от среднего. 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). Оценка полового развития проводилась согласно классификации Tanner (1968). Объем тестикул измерялся с помощью орхидометра Prader. Клиническая характеристика обследованных пациентов представлена в таблице 1.

С целью исследования экспрессии гена *PBEF1* в жировой ткани был произведен интраоперационный забор парных образцов висцеральной (ВЖТ) и подкожной жировой ткани (ПЖТ) объемом около 1 мл. Образцы крови для проведения гормонального

Таблица 2

Компоненты реакционной смеси (РТ-ПЦР)	
кДНК	2 мкл
10x буфер для TaqPol	2,5 мкл
(F+R) праймеры (10 мкМ)	1 мкл
Зонд (10 мкМ)	0,5 мкл
Смесь dNTPs (5 мМ)	1 мкл
Taq ДНК-полимераза (5 ед/мкл)	0,5 мкл
Вода	до 25 мкл

Таблица 3

Последовательности праймеров и зондов		
Ген	Праймер	Зонд
<i>PBEF1</i>	F = TGTGTAACTAATGGCCTTGGA	FAM-CTTCAAGGACCCAGTTGCT-
	R = ATCCCTGCTGGCGTCCTAT	GATCCC-BHQ1

исследования забирались перед оперативным вмешательством в утреннее время натощак.

Гормональные исследования включали определение висфатина (Visfatin C-terminal (human), Phoenix Pharmaceuticals inc., США) в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа.

Определение экспрессии гена *PBEF1* в висцеральной и подкожной жировой ткани проводилось методом полимеразной цепной реакции в «реальном времени» — РТ-ПЦР. 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° С 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). Реакцию проводили в объеме 25 мкл, компоненты реакционной смеси указаны в таблице 2.

Программа для проведения РТ-ПЦР:

1 цикл: 95° С — 3 мин.,

45 циклов: 95° С — 15 сек.,

60° С — 1 мин. (измерение флуоресценции).

Последовательности ген-специфичных праймеров и зондов для *PBEF1* указаны в таблице 3. Уровень экспрессии гена интереса оценивался относительно экспрессии house-keeping гена *b2m*.

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 использовался критерий Манна-Уитни, для сравнения двух зависимых выборок — критерий Вилкоксона, для сравнения более двух независимых выборок — ранговый анализ вариаций по методу Краскела-Уоллиса. Для анализа связи двух признаков использо-

Таблица 4

Уровень висфатина сыворотки крови в зависимости от стадии полового развития			
Стадия полового развития по Таннеру			p
1 (I)	2-3 (II)	4-5 (III)	
n=18 8,88 [7,1–10,8]	n=25 9,5 [8,4–11,3]	n=9 9,9 [8,5–11,0]	>0,05
Висфатин, нг/мл			

Примечание. Данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха.

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

Результаты и их обсуждение

Висфатин сыворотки крови у детей

Средняя концентрация висфатина сыворотки крови у детей составила 9,6 [7,5–11,1] нг/мл. Не было выявлено половых различий в содержании висфатина сыворотки крови: у мальчиков уровень висфатина сыворотки крови составил 9,4 [8,25–11,5] нг/мл, у девочек – 9,6 [7,1–11,1] нг/мл ($p=0,7$).

Исследуя особенности содержания висфатина в сыворотке крови у детей, мы выявили, что концентрация этого адипокина нарастает по мере полового развития, однако статистически незначимо (табл. 4.)

Согласно данным некоторых исследований, уровень висфатина сыворотки крови повышен у лиц с ожирением и прямо коррелирует с показателями ИМТ и ОТ [1, 2].

По результатам нашего исследования, не было обнаружено статистически значимого различия содержания висфатина в сыворотке крови у детей с нормальным весом и пациентов с избыточной массой тела и ожирением; так, сывороточная концентрация висфатина в группе детей с нормальной массой тела составила 9,2 [7,4–11,6] нг/мл, а в группе с избыточной массой тела – 9,5 [7,5–11,1] нг/мл ($p=0,5$). При проведении корреляционного анализа не было выявлено статистически значимых взаимосвязей между сывороточным содержанием висфатина, возрастом и основными антропометрическими показателями у детей.

Экспрессия гена – *PBEF1* (висфатина) 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. По данным

Таблица 6

Экспрессия гена <i>PBEF1</i> в зависимости от стадии полового развития			
Стадия полового развития по Таннеру			p
1 (I)	2 – 3 (II)	4 – 5 (III)	
n=18	n=25	n=9	>0,05
6,55 (4,65–6,6)	5,7 (4,2–6,7)	4,2 (2,8–6,1)	
<i>PBEF1</i> _{ВЖТ}			>0,05
5,1 (4,2–6,3)	4,95 (4,4–6,0)	3,9 (2,8–4,6)	
<i>PBEF1</i> _{ПЖТ}			

Примечание. Уровень экспрессии гена *PBEF1* выражен относительно экспрессии house-keeping гена *b2m*. Данные представлены в виде медианы (25–75%). Различия в экспрессии гена в зависимости от стадии пубертата оценены критерием Краскела-Уоллиса.

Таблица 5

Депо-специфические особенности экспрессии гена <i>PBEF1</i> в жировой ткани у детей			
	Все обследованные n=52	Нормальный вес n= 35	Избыток веса n=17
<i>PBEF1</i> _{ВЖТ}	5,35 [4,15–6,6]	5,7 [4,2–6,7]	4,9 [3,4–6,5]
	$p^*=0,34$		
<i>PBEF1</i> _{ПЖТ}	4,75 [4,2–6,0]	4,7 [3,9–6,1]	4,8 [4,4–5,7]
	$p^*=0,85$		
p#	0,002	0,002	0,3

Примечание. Уровень экспрессии гена *PBEF1* выражен относительно экспрессии house-keeping гена *b2m*. Данные представлены в виде медианы (25–75%). Различия экспрессии гена между подкожной и висцеральной жировой тканью оценены критерием Вилкоксона для парных сравнений ($p\#$). Различия между группами обследованных с нормальным весом и избытком веса оценены с использованием критерия Манна-Уитни (p^*).

А. Fukuhara с соавт., висфатин в основном экспрессируется в висцеральной жировой ткани, тогда как другие исследования не обнаружили достоверных различий в уровне мРНК *PBEF1* между висцеральной и подкожной жировой тканью [1, 4, 11]. Работ, посвященных исследованию экспрессии данного гена в жировой ткани у детей, до настоящего времени не проводилось.

По результатам нашего исследования 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 (табл. 5).

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 (табл. 5). 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-специфических отличий – *PBEF1*_{ВЖТ} – 5,1 [3,7–6,3], *PBEF1*_{ПЖТ} – 5,0 [3,9–6,1], ($p=0,29$).

Исследуя особенности экспрессии гена *PBEF1* в жировой ткани, мы выявили, что наиболее высокий уровень мРНК гена висфатина отмечается у детей в препубертате и отрицательно коррелирует 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) (табл. 6.) При проведении дисперсионного анализа статистически значимые отличия уровня экспрессии гена висфатина в зависимости от стадии полового развития были отмечены в подкожной жировой ткани только в группе обследованных девочек ($p=0,01$; Таннер1/Таннер4–5, $p=0,008$).

Таблица 7

Корреляционная взаимосвязь экспрессии гена *PBEF1* в жировой ткани с возрастом и антропометрическими показателями

R	<i>PBEF1</i> _{ВЖТ}	<i>PBEF1</i> _{ПЖТ}
Возраст	-0,08	-0,2
Рост	0,008	-0,08
SDS роста	0,28*	0,32*
Вес	-0,1	-0,1
ОТ	-0,1	-0,07
ИМТ	-0,11	-0,06
SDS ИМТ	-0,1	0,01

R – коэффициент корреляции Спирмена; * $p=0,02$.

В ряде исследований была продемонстрирована взаимосвязь между уровнем экспрессии гена *PBEF1* в жировой ткани с антропометрическими показателями. Так, в работе Berndt с соавт. 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 [1]. В другом исследовании экспрессия гена висфатина в подкожной жировой ткани отрицательно коррелировала с ИМТ [6].

По данным нашего исследования, 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 ($PBEF1_{ПЖТ}R=0,32$, $p=0,02$; $PBEF1_{ВЖТ}R=0,28$, $p=0,02$) (табл. 7). 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 основным ресурсом циркулирующего висфатина [3].

Выводы

1. Ген висфатина – *PBEF1* – статистически значимо выше экспрессируется в висцеральной жировой ткани, чем в подкожной жировой ткани ($p=0,002$), при этом наиболее высокий уровень его экспрессии отмечается у детей в допубертатном периоде и снижается по мере полового созревания.
2. Не обнаружено достоверных отличий содержания висфатина сыровотки крови у детей с нормальной массой тела и избытком веса, а также не выявлено корреляций с показателями ИМТ, SDS ИМТ и ОТ.

Литература

1. Berndt J., Kloting N., Kralisch S. et al. Plasma visfatin concentrations and fat depot-specific mRNA expression in humans // *Diabetes* 2005; 54: 2911–2916.
2. Davutoglu M., Ozkayab M. et al. Plasma visfatin concentrations in childhood obesity: relationships to insulin resistance and anthropometric indices // *Swiss. Med. Wkly* 2009; 139 (1–2): 22–27.
3. Dedoussis G.V., Kapiri A., Samara A. et al. Visfatin: the link between inflammation and childhood obesity. // *Diabetes Care* 2009; 32(6): 71.
4. Fukuhara A., Matsuda M., Nishizawa M. et al. Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin // *Science* 2005; 307: 426–30.
5. Kim M.K., Lee J.H., Kim H. et al. Crystal structure of visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor 1/nicotinamide phosphoribosyltransferase, free and in complex with the anti-cancer agent FK-866 // *J. Mol. Biol.* 2006; 362: 66–77.
6. Kovacicova M., Vitkova M., Klimcakova E. et al. Visfatin expression in subcutaneous adipose tissue of pre-menopausal women: relation to hormones and weight reduction // *Eur. J. Clin. Invest* 2008; 38: 516–522.
7. Martin P.R., Shea R.J., Mulks M.H. Identification of a plasmid-encoded gene from *Haemophilus ducreyi* which confers NAD independence // *J. Bacteriol.* 2001; 183: 1168–74.
8. Rongvaux A., Shea R.J., Mulks M.H., Gigot D., Urbain J., Leo O., Andris F. Pre-B-cell colony-enhancing factor, whose expression is up-regulated in activated lymphocytes, is a nicotinamide phosphoribosyltransferase, a cytosolic enzyme involved in NAD biosynthesis // *Eur. J. Immunol.* 2002; 32: 3225–34.
9. Samal B. et al. Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel human pre-B-cell colony-enhancing factor // *Mol. Cell. Biol.* 1994; 14(2): 1431–7.
10. Sommer G. et al. Visfatin/PBEF/Nampt: structure, regulation and potential function of a novel adipokine // *Clinical Science* 2008; 115: 13–23.
11. Varma V., Yao-Borengasser A., Rasouli N. et al. Human visfatin expression: relationship to insulin sensitivity, intramyocellular lipids, and inflammation // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2007; 92: 666–672.
12. Wang T., Zhang X., Bheda P., Revollo J.R., Imai S., Wolberger C. Structure of Nampt/PBEF/visfatin, a mammalian NAD⁺ biosynthetic enzyme // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2006; 13: 661–662.

Косыгина А.В.	аспирант НИИ детской эндокринологии, ФГУ «Эндокринологический научный центр» Минздравсоцразвития России
Сосунов В.В.	к.б.н., руководитель лаборатории ООО «ДНК-синтез»
Петеркова В.А.	проф., д.м.н., директор НИИ детской эндокринологии, ФГУ «Эндокринологический научный центр» Минздравсоцразвития России
Дедов И.И.	академик РАН и РАМН, директор ФГУ «Эндокринологический научный центр» Минздравсоцразвития России