

diseases / A.I. Efremova, S.V. Shishkin // Yakut medical journal, 2010. – №2 (30). – P. 26-28.

5. Карпенко М.А. Значение анализа электрокардиограммы с позиций синергетики в оценке степени поражения коронарных артерий у больных ИБС / М.А. Карпенко, М.В. Куренков, А.М. Жирков // Бюл. Федерального Центра сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова. – 2010. – № 5. – С. 39-43.

Karpenko M.A. The importance of analyzing the electrocardiogram from the standpoint of synergetics in assessing the degree of coronary artery disease in patients with IHD / M.A. Karpenko, M.V. Kurenkov, A.M. Zhirkov // Bulletin of the V.A. Almazov Federal Center for heart, blood and endocrinology. – M., 2010. – № 5. – P.39-43.

6. Марочков А.В. Оценка артериального давления с использованием правила «золотого сечения» / А.В. Марочков, С.А. Точило // Новости хирургии. – 2008. – №3, т.16 – С.126-131.

Marochkov A.V. Assessment of blood pressure using the rule of «golden section» / A.V. Marochkov, S.A. Tochilo // Surgery news. – 2008. – №3. – Vol.16. – P.126-131.

7. Ниши К. Золотые правила здоровья / К. Ниши. – СПб: «Невский проспект», 2006. – 128 с.

Nishi K. Golden rules of health / K. Nishi. – SPb., «Nevskij prospekt», 2006. – 128 p.

8. Общая заболеваемость взрослого населения России в 2016 году / Статистические материалы. – Ч. IV. – М., 2017. – 143 с.

The general morbidity of the adult population

of Russia in 2016 / Statistical materials. – Part IV. – M., 2017. – 143 p.

9. Распространенность артериальной гипертонии в РС(Я) / И.В. Корнильева, К.И. Иванов, Е.Ю. Алексеева [и др.] // Артериальная гипертония. – 2003. – №5, т.9. – С.182-184.

The prevalence of arterial hypertension in the RS(Ya) / I.V. Kornil'eva, K.I. Ivanov, E.Yu. Alekseeva, S.A. Shalnova, A.D. Deev // Arterial hypertension, 2003. – № 5. – Vol. 9. – P. 182-184.

10. Электронный адрес статистических данных по заболеваемости в Республике РС(Я) <https://www.gks.ru>

The electronic address of statistical data on morbidity in the Republic of the RS(Y). <https://www.gks.ru>.

**А.В. Ефремова, М.И. Томский, С. Чинти, Е.А. Исаков, В.А. Алексеев, А.А. Григорьева, Л.И. Константинова, Е.Д. Охлопкова, А.И. Яковлева, Л.Д. Олесова, Е.И. Семенова, З.Н. Кривошапкина**

## МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПРИ ХОЛОДОВОЙ ЭКСПОЗИЦИИ

DOI 10.25789/YMJ.2018.62.08  
УДК 611.018.5-07(571.56)

Проведено исследование на работниках ГОК, которые по своим профессиональным обязанностям находились при низких температурах воздуха от 2 до 9 ч. Выявлены достоверные корреляционные связи, доказывающие влияние холода на массу тела, индекс массы тела, объем талии и бедер. При анализе экспрессии генов показаны достоверные корреляционные связи генов-маркеров браунинга с длительностью нахождения на холоде.

**Ключевые слова:** холододовая экспозиция, бурая жировая ткань, метаболизм липидов, ожирение.

We investigated 200 employees of the diamond mining company who worked in cold condition from 2 to 8 hours a day. Reliable correlations have been revealed that prove the effect of cold on body mass, body mass index, waist and hip volumes. Cold exposure increased expression of genes markers of browning. At analyzing gene expression, reliable correlations of the genes-browning markers with the duration in the cold are shown.

**Keywords:** cold exposure, brown adipose tissue, lipid metabolism, obesity.

**Введение.** Открытие бурой жировой ткани (БЖТ) вызвало большой интерес к изучению возникновения этой термогенетической ткани, терапевтический эффект которой лежит в основе борьбы с ожирением и связанными с ним осложнениями.

Холодовая экспозиция – один из сильнейших стимуляторов активации бурой жировой ткани. Процесс актива-

ции БЖТ проявляется в росте бежевых адипоцитов в депо белой жировой ткани, и этот процесс называется браунинг.

Известно, что млекопитающие имеют два вида жировой ткани – белую и бурую. Белая жировая ткань в основном состоит из белых адипоцитов, которые являются складом избытка жира, предназначенного для сохранения энергии, в виде большой липидной капли. БЖТ состоит из многокамерных адипоцитов, которые специализируются в окислении жира, вырабатывая в процессе термогенеза тепло в ответ на стимуляцию холодом или в процессе стимуляции β-адренергическими рецепторами.

Термогенетическая активность БЖТ связана с присутствием митохондриального белка UCP1 и представляет важную часть в энергетическом расходовании критического и полного энергетического баланса. Главным термогенетическим раздражителем в холододовой экспозиции являются: стимуляция симпатической нервной системы холодом и влияние β-адренергических антагонистов, вызванных окислением жирных кислот в жировой ткани и термогенезом в БЖТ,

приводящим к росту размера ткани [3, 5, 7, 15-17]. Кроме того, стимуляция β-адренергических рецепторов холодом способствует процессу браунинга, при котором происходит образование бежевых адипоцитов (brite) [1, 4-7, 10, 25]. Эти адипоциты имеют промежуточную форму между бурой и белой жировой тканью, специфическую экспрессию генов и некоторые черты, характерные для классических бурых адипоцитов, такие как экспрессия белка UCP-1 в мРНК [1, 2, 9, 18, 19, 21, 22]. На примере исследований на грызунах известно, что процесс браунинга может увеличивать расход энергии и способствует поддержанию веса тела [2, 8, 20]. Интерес к исследованиям БЖТ появился, когда были доказаны случаи активной БЖТ у взрослых людей [12]. На данный момент основным вопросом, обсуждаемым мировым сообществом, является возможность активировать или увеличить массу БЖТ у взрослых людей, так как активная БЖТ может играть значительную роль в контроле энергетического гомеостаза и способствовать разработке препаратов для лечения ожирения.

**Цель исследования** – выявить за-

**ЕФРЕМОВА Аграфена Владимировна** – к.б.н., с.н.с. ЯНЦ КМП, Phd, студент Университета Политехника дель Марке (Италия), [a.efremova01@mail.ru](mailto:a.efremova01@mail.ru); **ТОМСКИЙ Михаил Иннокентьевич** – д.б.н., проф., [ogus@mail.ru](mailto:ogus@mail.ru); **ЧИНТИ Саверио** – MD, проф. Ун-та Политехника дель Марке, директор Центра по изучению ожирения (Италия); ЯНЦ КМП: **ИСАКОВ Евгений Андреевич** – м.н.с., врач патологоанатом РБ №1-Национального центра медицины МЗ РС(Я), **АЛЕКСЕЕВ Владислав Амирович** – м.н.с., **ГРИГОРЬЕВА Анастасия Анатольевна** – м.н.с., **КОНСТАНТИНОВА Лена Ивановна** – н.с., **ОХЛОПКОВА Елена Дмитриевна** – к.б.н., вед.н.с.-руковод. лаб., **ЯКОВЛЕВА Александр Иванович** – м.н.с., **ОЛЕСОВА Любовь Дыгиновна** – к.б.н., вед.н.с.-руковод. лаб., **СЕМЕНОВА Евгения Ивановна** – к.б.н., с.н.с., **КРИВОШАПКИНА Зоя Николаевна** – к.б.н., с.н.с.

висимость антропометрических и метаболических показателей от длительности нахождения на холоде.

**Материал и методы исследования.** В 2016 г. был собран биоматериал (кровь) на генетический и биохимический анализы у 186 работников ГОК, в основном у проходчиков, которые открытым способом добывают алмазосодержащий грунт в зимний сезон. Работники проводили на холоде от 2 до 9 ч в сут в зависимости от профессиональных обязанностей.

Первую группу составили 76 работников, которые проводили при низких температурах от 2 до 4 ч. Вторая группа включала в себя 110 проходчиков, время холодовой экспозиции составило от 6 до 9 ч в день.

Всем исследованным были проведены антропометрические измерения с определением роста, индекса массы тела (ИМТ), объема талии (ОТ), окружности бедер (ОБ), соотношения ОТ/ОБ. Индекс массы тела рассчитывали как отношение массы тела (кг) к росту ( $m^2$ ). При оценке ИМТ использовали критерии ВОЗ (WHO..., 2000). Окружность талии измеряли в положении стоя на середине расстояния от нижнего края реберной дуги до гребня подвздошной кости. Окружность бедер измеряли в положении стоя на уровне больших вертелов бедренных костей.

Глюкоза, общий холестерин (ХС), липопротеиды высокой плотности (ЛПВП), триглицериды (ТГ) определялись энзиматическим методом на автоматическом анализаторе Labio 200 с использованием наборов Bioson (Германия).

Общая РНК была выделена из периферической крови испытуемых с использованием реагента Trizol. Качество полученных образцов РНК было оценено на нанофотометре IMPLEN P-300 (Германия). После определения качества образцы РНК хранились при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Экспрессия генов в молекулярные клетки периферической крови (МКПК) была определена на реал-тайме RT-PCR SFX96 (Германия) (табл.1). Обратная транскрипция была проведена с использованием набора iScript cDNA synthesis kit («Bio-Rad», Германия), на термощиклере T-100 Thermal Cycler («Bio-Rad», Германия). Условия реакции были следующие: 5 мин при  $+25^{\circ}\text{C}$ , 30 при  $42^{\circ}\text{C}$  и 5 мин при  $85^{\circ}\text{C}$ . Каждая ПЦР-проба состояла из разбавленной пробы кДНК (1:5), прямого и обратного праймера ( $1\mu\text{M}$ ), раствора SYBR Green PCR Master Mix («Bio-Rad») и DEPC воды, общий объем составил  $20\mu\text{l}$ .

Условия ПЦР реакции: 15 мин при  $95^{\circ}\text{C}$ , 1 мин при  $60^{\circ}\text{C}$  и 15 с при  $95^{\circ}\text{C}$ . Исследование проводилось на базе отдела изучения механизмов адаптации ЯНЦ КМП.

Все исследования выполнены с информированного согласия испытуемых в соответствии с этическими нормами Хельсинкской декларации (2000).

Статистический анализ материалов исследования выполнен с использованием программы SPSS (версия 19). Проверку на нормальность распределения изучаемых количественных показателей проводили по тесту Колмогорова-Смирнова. Достоверность различий между средними величинами оценивали с помощью критерия  $t$  Стьюдента для независимых выборок, вероятность справедливой гипотезы принимали при  $p \leq 0,05$ . Корреляционный анализ проводили по Пирсону. Данные в таблицах представлены в виде  $M \pm m$ , где  $M$  – среднее арифметическое,  $m$  – ошибка среднего.

**Результаты и обсуждение.** При статистическом анализе антропометрических данных нами показано, что у работников с длительной экспозицией на холоде (до 9 ч в сут) выявлено достоверное снижение веса ( $r=0,359$ ,  $p=0,01$ ) и, соответственно, ИМТ ( $r=0,435$ ,  $p=0,00$ ) (табл.2).

Также при длительной холодовой экспозиции (до 9 ч в сут) достоверно снижаются ОТ ( $r=0,263$ ,  $p=0,01$ ) и ОБ ( $r=0,171$ ,  $p=0,026$ ). Результаты нашей работы подтверждают исследование Saito M. et al (2009), в котором доказана взаимосвязь наличия активной

БЖТ с худобой исследуемых лиц. По литературным данным, средняя масса БЖТ в теле здорового взрослого человека примерно 50 г. Несмотря на малое количество в организме, БЖТ может иметь непропорционально большой метаболический эффект.

По данным Международной диабетической федерации, в России 10,9 млн. больных страдают сахарным диабетом, в среднем у 11,9 чел. имеется нарушенная толерантность к глюкозе и нарушенная гликемия натощак. Ожирение, обычно предшествующее диабету, возникает в результате изменения содержания глюкозы в крови. Действительно, адипоциты регулируют инсулинорезистентность, где половина липидов из белой жировой ткани являются депо и регулируют сигналы инсулина. Также доказана взаимосвязь наличия БЖТ с истощением [17] и эугликемией [13]. Данные исследователи предполагают, что адипоциты бурой жировой ткани могут влиять на метаболические процессы, такие как ожирение и диабет. Уникальная особенность БЖТ заключается в предполагаемых эффектах повышения энергетического расходования и контроля избытка глюкозы в крови [3]. При исследовании расходования свободной глюкозы у грызунов выявлено, что после стимуляции холодом БЖТ расходует глюкозу и свободные жирные кислоты для термогенеза (выработки тепла), что доказывает регуляторную роль БЖТ в гомеостазе глюкозы и инсулинорезистентности.

В настоящее время физиологиче-

Таблица 1

Последовательность нуклеотидов праймеров, использованных для реал-тайма ПЦР

| Gene                   | Forward Primer (5'-3') | Reverse Primer (5'-3') |
|------------------------|------------------------|------------------------|
| Cidea                  | ATCGGCTCCTTAACGTGAA    | AACCGCAGCAGACTCCTCA    |
| Cpt1a                  | TCCACGATTCCACTCTGCTC   | CAGCAACCCCGTGGCC       |
| Hoxc9                  | CAGCAACCCCGTGGCC       | CCGAGGTCCCTGGTTAAA     |
| Prdm16                 | CCCAACAAGTACAGCCTGGA   | GCGGATGAGGTTGGACTTCC   |
| Slc27a1                | GCGATATACCAGGAGCTGCA   | TCTTGAAGGTGCCTGTGGTG   |
| GAPDH (reference gene) | GTCGGAGTCAACGGATTTGGT  | AGTGATGGCATGGACTGTGG   |

Cidea, cell death-inducing DNA fragmentation factor- $\alpha$ -like effector A; Cpt1a, carnitine palmitoyl transferase 1a; Hoxc9, homeo box C9; Prdm16, PR domain containing protein-16; Slc27a1, solute carrier family 27.

Таблица 2

Антропометрические показатели исследуемых групп

|                        | 1-я N=76                 | 2-я n=110         |
|------------------------|--------------------------|-------------------|
|                        | Холодовая экспозиция (ч) |                   |
|                        | 2 – 4                    | 5 – 8             |
| Возраст, годы          | 32,16 $\pm$ 1,41         | 31,29 $\pm$ 0,66  |
| Рост, см               | 170,72 $\pm$ 0,67        | 171,81 $\pm$ 0,56 |
| Вес, кг                | 75,66 $\pm$ 1,34         | 71,32 $\pm$ 1,24  |
| ИМТ, кг/м <sup>2</sup> | 25,97 $\pm$ 0,42         | 23,96 $\pm$ 0,36  |
| ОТ, см                 | 89,11 $\pm$ 1,74         | 83,15 $\pm$ 1,41  |
| ОБ, см                 | 96,15 $\pm$ 1,50         | 93,62 $\pm$ 1,37  |
| ОТ/ОБ                  | 0,91 $\pm$ 0,01          | 0,83 $\pm$ 0,02   |

Таблица 3

Биохимические показатели в зависимости от длительности экспозиции на холоде

| Показатель           | 1-я группа n=76 | 2-я группа n=110 |
|----------------------|-----------------|------------------|
|                      | M±m             |                  |
| Глюкоза, ммоль/л     | 5,41±0,14       | 5,18±0,98        |
| ТГ, ммоль/л          | 1,32±0,09       | 1,15±0,05        |
| ХС, ммоль/л          | 4,63±0,75       | 4,64±0,07        |
| ХС ЛПВП, ммоль/л     | 1,19±0,28       | 1,39±0,03        |
| ХС ЛПНП, ммоль/л     | 2,80±0,08       | 2,69±0,08        |
| ХС ЛПОНП, ммоль/л    | 0,59±0,04       | 0,53±0,02        |
| Коэфф. атерогенности | 3,13±0,14       | 2,55±0,11        |

ская роль БЖТ в активации показателей метаболизма у людей изучена недостаточно. Исследователи Orava J. и др. [14] и Ouellet V. и др. [13] выявили, что при холодовой экспозиции наблюдается 12-кратное повышение концентрации глюкозы в адипоцитах БЖТ, но не в других тканях. Это предполагает, что после активации БЖТ способствует расходу глюкозы в плазме крови. Но несмотря на это, эти исследователи не показали различий содержания свободноциркулирующей глюкозы между группами с наличием БЖТ и отсутствием БЖТ, что вызывает вопрос в способности адипоцитов БЖТ влиять на метаболизм глюкозы в крови. При сравнении двух исследуемых групп с разной длительностью экспозиции на холоде мы не выявили никаких достоверных различий, содержание глюкозы в крови у исследованных находилось в пределах нормы (табл.3).

Изучение БЖТ у людей требует инвазивных методик, таких как биопсия жировой ткани или использование позитронно-эмиссионной томографии, которое подразумевает использование радиоактивных изотопов. Поэтому необходимо использование безопасного и доступного источника биомаркеров. Мононуклеарные клетки периферической крови это легкодоступный биологический материал, который может быть использован для изучения бурой жировой ткани с минимальной инвазией. МКПК составляют фракцию крови, состоящую в основном из лимфоцитов и моноцитов. Эти клетки циркулируют в теле и отвечают за внутренние и внешние сигналы, экспрессирующие большое количество генов, которые включают тканеспецифические транскрипции и отражают метаболическую адаптацию. МКПК способны вырабатывать около 80% всего генома, включая тканеспецифические транскрипты. Несмотря на то, что эти клетки не могут экспрессировать главный ключевой термогенетический ген *UCP1*, они способны вырабатывать маркеры браунинга, такие как *Cidea*, *Нохс9*, *Prdm16* и *Slc27a1*. Нами выявлено,

что длительная холодовая экспозиция повышает экспрессию маркеров браунинга *Slc27a* ( $r = 0,421$ ,  $p=0,01$ ), *Нохс9* ( $r = 0,164$ ,  $p=0,032$ ), *Cpt1a* ( $r = 0,270$ ,  $p=0,00$ ) и *Cidea* ( $r = 0,187$ ,  $p=0,014$ ). Полученные данные показывают, что МКПК могут отражать изменения в экспрессии генов в ответ на холод, и доказывают полноценность использования МКПК как метода для выполнения исследования, связанного с активацией бурой жировой ткани у людей.

#### Выводы

1. Выявлена достоверная отрицательная корреляция массы тела, объема талии и объема бедер в зависимости от длительности экспозиции на холоде.
2. Данные показатели у исследованных снижались при длительной экспозиции на холоде.
3. При анализе биохимических показателей не выявлено существенных изменений.
4. Нами показаны достоверные корреляционные связи между маркерами процесса браунинга и экспозицией на холоде.

#### Литература

1. Barbatelli G., Murano I., Madsen L. The emergency of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation // *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298: E1244 – E1253, 2010.
2. Bonet ML., Oliver P., Palou A. Pharmacological and nutritional agents promoting browning of white adipose tissue // *Biochim Biophys Acta* 1831: 965 – 985, 2013.
3. Cannon, B., Nedergaard, J. Brown adipose tissue: function and physiological significance // *Physiol. Rev.* 84. 277 – 359., 2004.
4. Cinti S. The adipose organ. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 73: 9 – 15, 2005.
5. Cinti S., Cancelli R., Zingaretti MC., [et al.]. CL 316,243 and cold stress induce heterogeneous expression of *UCP1* mRNA and protein in rodent brown adipocytes // *J Histochem* 50: 21 – 31, 2002.
6. Frontini A., Cinti S. Distribution and development of brown adipocytes in the murine and human adipose organ // *Cell Metab.* 11, 253 – 256, 2010.
7. Fuster A., Oliver P., Sanchez J. [et al.]. *UCP1* and oxidative capacity of adipose tissue in adult ferrets (*Mustela putorius furo*). *Comp Biochem physiol A Mol Integr Physiol* 153: 106 – 112, 2009.

8. Kopesky J., Hodny Z., Rossmeisl M. [et al.]. Reduction of dietary obesity in aP2-Ucp transgenic mice: physiology and adipose tissue distribution // *Am J Physiol Endocrinol Metab* 270: E768 – E7752, 1996.

9. Lasar D., Julius A., Fromme T., Klingenspor M. Browning attenuates murine white adipose tissue expansion during postnatal development // *Biochim. Biophys Acta* 1831: 960–968, 2013.

10. Lee YH., Petkova AV, Mottillo EP., Granneman JG. In vivo identification of bipotential adipocyte progenitors recruited by  $\beta$ 3-adrenoreceptor activation and high-fat feeding // *Cell Metab* 15: 480 – 491, 2012.

11. Liew CC., Ma J., Tang HC. [et al.]. The peripheral blood transcriptome dynamically reflects system wide biology: a potential diagnostic tool // *J Lab Clin Med* 147: 126 – 132, 2006.

12. Nedergaard J., Bengtsson T., Cannon B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans // *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism* 2007. 293 E444-E452.

13. Ouellet V., Routhier-Labadie A., Bellemare W. [et al.]. Outdoor temperature, age, sex, body mass index, and diabetic status determine the prevalence, mass, and glucose-uptake activity of 18F-FDG-detected BAT in humans // *Journal of Clinical Endocrinology&Metabolism*. 2011. 96. - P.192–199.

14. Orava J. et al. Blunted metabolic responses to cold and insulin stimulation in brown adipose tissue of obese humans. *Obesity (Silver spring)* 21, 2279 – 2287, 2013.

15. Palou A., Pico C., Bonet M.L., Oliver P. The uncoupling protein, thermogenin // *J Biochem Cell Biol* 30: 7 – 11, 1998.

16. Rodriguez A.M., Palo A. Uncoupling proteins: gender dependence and their relation to body weight control. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28: 500 – 502, 2004.

17. Saito M., Okamatsu-Ogura Y., Matsushita M. [et al.]. High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity // *Diabetes* 58, 1526 – 1531 (2009).

18. Seal P., Conroe HM., Estall J. [et al.]. *Prdm 16* determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice // *J.Clin. Invest.* 121, 96 – 105, 2011.

19. Walden TB., Hansen IR., Timmons JA. [et al.]. Recruited vs J. nonrecruited molecular signatures of brown, 'brite', and white adipose tissues // *Am J Physiol Endocrinol Metab* 302: E 19 – E31, 2012.

20. Wu J., Coulter A., Rim JS. Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange // *Circ. Res.* 107, 1047– 1057, 2005

21. Wu J. [et al.]. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human // *Cell* 150, 366 – 376, 2012.

22. Wu Y [et al.]. Identification of miR-106b-93 as a negative regulator of brown adipocyte differentiation // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 438, 575 – 580, 2013.

23. Wu L. [et al.]. Profiling peripheral microRNAs in obesity and type 2 diabetes mellitus. *APMIS* 123, 580 – 585, 2015.

24. WHO. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report on a WHO Consultation. Technical report series, № 894/WHO. – Geneva, 2000. – 265 p.

25. Xue B., Coulter A., Rim J.S. [et al.]. Transcriptional synergy and the regulation of *UCP1* during brown adipocyte induction in white fat depots // *Mol Cell Biol* 25: 8311-8322, 2005.