

ВЛИЯНИЕ МЕХАНИЧЕСКОГО МАССАЖА НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ И МЕТАБОЛИЗМ ЛИПИДОВ В ЖИРОВОЙ ТКАНИ ЯГОДИЧНО-БЕДРЕННОЙ ОБЛАСТИ

Marie-Adeline Marques,^{a,b} Marion Combes,^{a,b} Balbine Roussel,^{a,b} Laurence Vidal-Dupont,^c Claire Thalamas,^{a,d} Max Lafontan,^{a,b} Nathalie Viguerie^{a,b}

^a Inserm, UMR 1048, Obesity Research Laboratory, Cardiovascular and Metabolic Medicine Institute,

^b IFR150, Biomedical Research Federative Institute of Toulouse, Paul Sabatier University, University of Toulouse, Toulouse,

^c Physiotherapy Center, Saint-Orens de Gameville,

^d Clinical Investigation Center Inserm CIC-9302, University Hospital Centre of Toulouse, France

Ключевые слова: жировая ткань области бедра, изопротеренол-индуцированный липолиз, микродиализ, кровообращение жировой ткани

Описание

Жировая ткань ягодично-бедренной области (ЖТЯБО), как известно, отличается низким метаболизмом. Ранее было опубликовано, что механический массаж оказывает влияние на морфологические и функционирование на жировую ткань. Данное исследование проведено для более глубокого понимания влияния механического массажа на экспрессию генов и β -адрено-зависимую жировую мобилизацию в ягодично-бедренной области у женщин.

Метод

Двенадцати здоровым женщинам пременопаузального возраста проведены 12 процедур дозированного механического массажа по технологии Endermologie®. Общая РНК выделена из биоптатов жировой ткани области бедер для изучения экспрессии генов. Микродиализ проводился на жировой ткани области бедер с целью оценки восприимчивости к липолитикам (с помощью определения глицерина) и изменения локального кровотока после перфузии липолитика (изопротеренол). Исследования проведены до и спустя 6 недель.

Результат

Механический массаж запускает существенные изменения в профиле экспрессии генов. Липидомобилизирующий эффект изопротеренола был выше после окончания процедур. Также был усилен кровоток и индуцированная изопротеренолом вазодилатация.

Заключение

Механический массаж, используемый в исследовании, вызвал заметные изменения в экспрессии генов, отвечающих за метаболизм. Липолитический эффект и эффект усиления кровотока, вызванные изопротеренолом были достоверно усилены.

Введение

Тип распределения жировой ткани является важным фактором риска сердечно-сосудистых и эндокринных заболеваний. Некоторые исследования обнаружили что риск для здоровья связан с абдоминальным (висцеральным) ожирением. Изучение биологии и физиологии жировой ткани показало значительные отличия в механизме захвата жирных кислот и восприимчивости к липолитикам между висцеральными и глутеофemorальными жировыми отложениями. Так же описана разница в кровоснабжении этих отложений. Адипоциты висцерального жира относительно меньше и более восприимчивы к липидосжигающим гормонам, тогда как подкожная жировая ткань ягодично-бедренной области (ЖТЯБО) более инертен¹. Гипертрофия жировых клеток обнаружена только в ЖТЯБО. Кроме того, описаны вено-лимфатические расстройства в жировой ткани ягодично-бедренной области. Защитная (протективная) роль ЖТЯБО предполагается у лиц с метаболическим синдромом и сопутствующими заболеваниями²⁻⁵. Тем не менее, ЖТЯБО часто удаляется липосакцией при нормальном весе или незначительном повышении веса с косметическими целями. Эти женщины часто имеют женский морфотип с низким соотношением талия/бедро. Множество слабоизученных методик предлагается для коррекции этой области, как поверхностного воздействия, так и более инвазивных, таких как инъекции детергентов^{6,7} и лазерная терапия⁸. Различные методики могут оказывать вредный эффект и требуют оценки их безопасности или эффективности с использованием

методов изучения функционирования жировой ткани. Неинвазивные технологии дозированного механического массажа, как известно, оказывают циркуляторный и трофические эффекты⁹⁻¹², уменьшают окружности тела, толщину кожной складки и целлюлит¹²⁻¹⁵. Достоверно оценить ожидаемое соотношение риск-выгода невозможно без изучения биологических или физиологических факторов. Были запланированы эксперименты по изучению влияния массажа на экспрессию генов с помощью высоко-производительных методик. В дополнение, были изучены изопротеренол-индуцированный липолиз и изменения кровотока методом микродиализа *in situ* до и после 12 процедур дозированного механического массажа.

Общая транскрипция была анализирована с использованием транскрипционного микрочипа. В настоящее время, анализ экспрессии генов в различных тканях широко используется в исследованиях, посвященных здоровью человека^{16,17}. Широкомасштабный подход позволяет изучать непрогнозируемые биологические процессы и молекулярные взаимодействия с неизвестными молекулами. Исследования генома жировой ткани специализировались на изучении изменений, вызванных диетой¹⁸, и обнаружили новые молекулярные маркеры^{19,20}. Подобный подход был выбран для сравнительного исследования последствий механического массажа ЖЯБО.

Расщепление ЖТЯБО регистрировалось методом микродиализа *in situ*. Камеры для микродиализа были имплантированы в ЖТЯБО для непрерывного замера уровня глицерола во внеклеточном пространстве (как маркера липолитической активности). Кроме того, через камеры вводились липолитики для стимулирования расщепления жира в адипоцитах. Использование метода микродиализа предотвращает системный эффект вводимых липолитиков. Исследования *in situ* и *in vivo* позволяют изучать реакцию адипоцитов в их естественной среде путем измерения высвобождения глицерина и оценки изменений локального кровотока, которые имеют важное значение в регуляции липолиза²¹. Это было широко использовано для выявления роли $\beta_{1,2}$ - и α_2 -адренорецепторов и влияния предсердного натрийуретического гормона (ПНГ) в управлении липолизом в подкожной жировой ткани у худых и полных людей²¹.

Материалы и методы

Субъекты

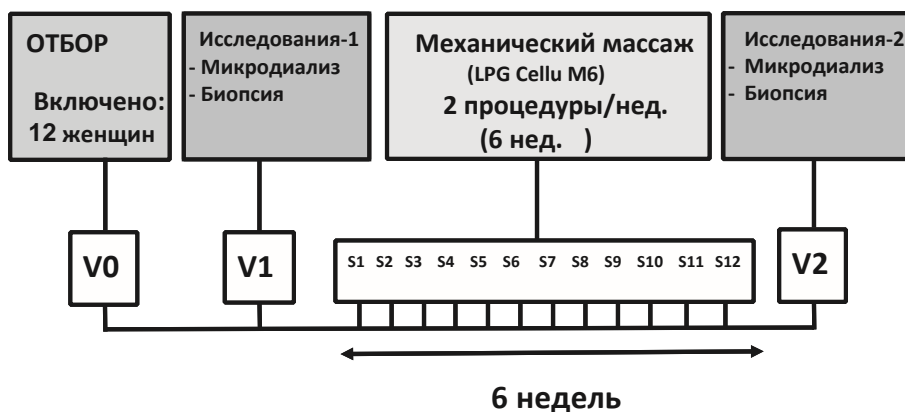
Двенадцать здоровых женщин, европейского происхождения, в менопаузе (средний возраст 31,8 лет) были приглашены в Клинико-исследовательский центр в Тулузе, Франция. Все женщины имели гиноидный фенотип со следующими параметрами: высота 160 см (95% доверительный интервал (ДИ) 160-170), вес - 70,7 кг (95% ДИ - 66,8-74,5), индекс массы тела (ИМТ) - 26,8 кг/м² (95% ДИ - 26-27,5), соотношение талии к бедрам - 0,8 (95% ДИ - 0,79-0,82).

Все они практически здоровы, с нормальными биохимическими показателями плазмы крови и на КОК. Критериями исключения были диабет, гипертония, дислипидемия, прием антидепрессантов, прием средств для снижения веса. Всем женщинам рекомендовано придерживаться обычной диеты на протяжении всего исследования. Никто из них не занимался регулярными физическими упражнениями и не контролировал поступление калорий.

Исследование было одобрено Комитетом по этике Тулузского Университетского госпиталя и участники дали свое письменное информированное согласие.

Дизайн исследования

Дизайн исследования представлен на рисунке 1.



Набор добровольцев, биопсия ЖТЯБО и микродиализ были произведены в Клинико-исследовательском центре при госпитале Пюрпан, Тулуза, Франция. Биохимические исследования и транскриптомный анализ были произведены в Лаборатории изучения ожирения при госпитале Рануель, Тулуза, Франция.

Регламент механического массажа

Массаж проводился по технике Endermologie®, физиотерапевтом, обученным работе с массажным аппаратом. Каждый доброволец в общей сложности получил 12 процедур длительностью по 30 минут каждая. Процедуры повторялись дважды в неделю (рисунок 1). Устройство для массажа имеет процедурную насадку-манипулу, в которой находятся два ролика с независимыми двигателями и всасывающая система, позволяющая захватывать кожу и подкожные ткани (Cellu M6; LPG Systems, Valence, France).

Результаты, посвященные морфометрии (измерению окружности и толщины жировой складки) были описаны в предыдущем исследовании¹⁵, поэтому настоящее исследование изучает биологический ответ.

Биопсия ЖТЯБО и приготовление общей РНК

Биопсии были взяты аспирационной иглой под локальной анестезией утром натощак и хранились при -80°C до окончания исследования. Общая РНК из биоптатов была выделена с использованием RNeasy total RNA Mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Уровень общей РНК и качественный анализ произведен методом капиллярного электрофореза в Experion analyzer (BioRad, Marnes-la-Coquette, France).

Микрочиповый анализ

Целевая РНК была получена из 500 нг общей РНК с помощью амплификатора Agilent low RNA input amplification kit (Agilent Technologies, Massy, France). Пробы до начала процедур были мечены Cy3, пробы после завершения процедур мечены Cy5. Пробы одного добровольца были очищены и гибридизованы на олигонуклеотидном микрочипе 4 × 44 k oligonucleotide arrays, Agilent Technologies, как описано в работе¹⁹. Изображения были получены с помощью сканера InnoScan 700 (Innopsys, - Carbonne, France) и проанализированы с помощью программы Marix (Innopsys).

Качество гибридизации проверялось с помощью контролей. Отклонения повторов и точек с отношением сигнал-шум менее чем 2 (и для красного и для зеленого каналов) были исключены из анализа. Пригодными для анализа признаны 18 466 точек.

Полученные данные были нормализованы по общему методу Loess и фильтрованы R набором LIMMA (Bioconductor). Метод главных компонент использовался для достоверности последовательности данных, показанных микрочипом. Отличия в генах обнаруживались методом достоверного микрочипового анализа²³. Функциональный анализ проведен с использованием Ingenuity Pathway Analysis (IPA) version 8.6²⁴, в качестве референса - набор Agilent whole genome.

Количественная ПЦР в режиме реального времени

Обратная транскрипция произведена с 1 мг общей РНК, случайными гексамерами и поли-dT, в соответствии с набором High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)¹⁹. Для стандартизации экспрессии генов использовался метод TaqMan[®] (Applied Biosystems) с 18S (Taqman[®] Control Assays; Applied Biosystems).

Микродиализ

Довробольцы были обследованы в 8 утра, натощак, перед и после проводимой процедуры механического массажа. Под местной анестезией (5% пластырь Emla[®] (AstraZeneca, Rueil-Malmaison, France) на 20 минут, и 200 ml 1% р-ра лидокаина (Roger-Bellon, Neuilly-sur-Seine, France)) была имплантирована капсула для микродиализа (20 × 0.5 mm, 20-kDa molecular-weight cut-off; CMA Microdialysis, Solna, Sweden). Место имплантации - по условной линии, соединяющей надколенник и верхнюю переднюю подвздошную ость, на расстоянии 2/3 от надколенника. Для контроля в том же месте на другом бедре была имплантирована такая же капсула для микродиализа. Обе капсулы были подсоединены к микро-помпе, которая подавала стерильный раствор Рингера. С учетом данных предыдущих исследований^{25,26}, скорость перфузии и составляла 2 мл/мин, а отбор проб производился после 30 минутного периода калибровки. После отбора проб для определения базового уровня, в одну капсулу подавался изопротеренол (агонист β-адренорецепторов) в нарастающих концентрациях (0, 1; 1 и 10 ммоль в растворе Рингера). В контрольную пробу подавался раствор Рингера. В перфузию был добавлен этанол (1,7 г/л) для оценки изменений кровотока жировой ткани (КЖТ), как было показано ранее²⁵. Этот метод показывает изменения КЖТ возникающие в течение перфузии фармакологических препаратов или при изменении физиологических условий. Результаты измерений для каждой фракции диализата приведены на рисунках 2 и 3. Уровень этанола измерялся сразу же, а пробы для определения глицерина были заморожены и хранились при - 80°C до окончания экспериментов.

Рисунок 2. Изменение высвобождения глицерина в ЖТЯБО, вызванное изопротеренолом, после проведения механического массажа. Для сравнения с показателями до массажа, $p > 0.05$.

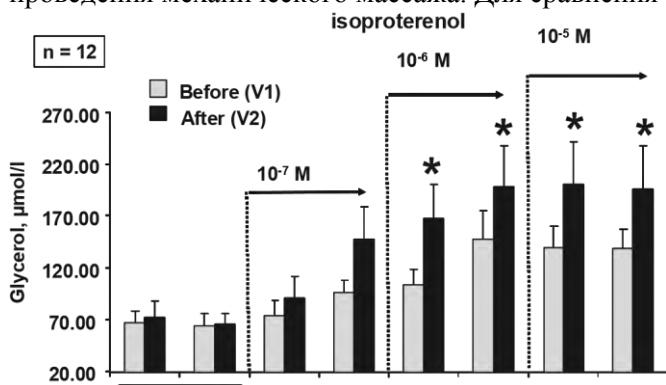
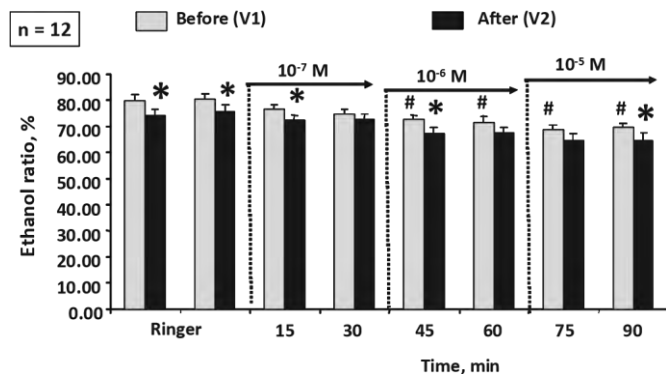


Рисунок 3. Изменения кровотока в ЖТЯБО, вызываемые изопротеренолом, перед и после процедур механического массажа. Для сравнения с показателями до массажа, $p > 0.05$.



Биохимический анализ

Определение уровня глицерина в диализате было проведено ферментным методом с использованием реактивов Sigma, Saint Louis, MO, USA, как это описано ранее²⁶. Коэффициент вариации в исследовании составил 7,6-8,0% и между исследованиями - 8,8-9,6%. Определение уровня этанола в перфузионном растворе и диализате было проведено ферментным методом. Внутри и между исследованиями коэффициент вариации составил 3,0% и 4,5% соответственно.

Статистический анализ

Все значения исследований приведены как средние \pm стандартное отклонение значения. Статистический анализ проводился SPSS для Windows 17,0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA)

Результаты

Изменения экспрессии генов в ЖТЯБО вызванные сеансами механического массажа

Статистическим анализом выявлено 2 259 уникальных различно экспрессированных транскриптов, с изменением экспрессии от 1,2 до 6,9 и от 0,9 до 0,4 для индуцирующих и репрессивных генов, соответственно. В таблице 1 перечислены по 20 генов каждой группы, экспрессия которых изменилась после механического массажа.

Таблица 1.

Обозначение гена	Среднее изменение	Продукт трансляции
<i>Индущивные гены</i>		
SPP1	6.9	secretedphosphoprotein1
RARRES1	6.5	retinoicacidreceptorresponder(tazarotene-induced)1
IL1RN	5.6	interleukin1receptorantagonist
ABCG2	5.5	ATP-bindingcassette,sub-familyG(WHITE),member2
MMP7	5.3	matrixmetallopeptidase7(matrilysin,uterine)
CHIT1	5.3	chitinase1(chitotriosidase)
PLA2G7	5.2	phospholipaseA2,groupVII
AADACL1	5.2	arylacetamidedeacetylase-like1
APOC1	5.1	apolipoproteinC-1
EBI2	5.0	Gprotein-coupledreceptor183
EGR2	4.4	earlygrowthresponse2
ATP1B1	4.3	ATPase,Na+/K+transporting,beta1polypeptide
MMP9	4.2	matrixmetallopeptidase9
PRG4	4.1	proteoglycan4
RAB11FIP4	4.0	RAB11familyinteractingprotein4(classII)
ACP5	4.0	acidphosphatase5,tartrateresistant
CCL18	3.9	chemokine(C-Cmotif)ligand18
DHRS9	3.9	dehydrogenase/reductase(SDRfamily)member9
TREM2	3.7	triggeringreceptorexpressedonmyeloidcells2
NLRC4	3.7	NLRfamily,CARDdomaincontaining4
<i>Репрессивные гены</i>		
FGD5	0.5	FYVE,RhoGEFandPHdomaincontaining5
CD63	0.5	CD63molecule
EEF1A1	0.5	eukaryotictranslationelongationfactor1alpha1
ZNF409	0.5	zincfingerprotein409
KIAA0831	0.5	KIAA0831
SAA1	0.5	serumamyloidA1
CXorf36	0.5	chromosomeXopenreadingframe36
IQCE	0.5	IQmotifcontainingE
C10orf116	0.5	chromosome10openreadingframe116
RPLP2	0.4	ribosomalprotein,large,P2
G0S2	0.4	G0/G1switch2

THRAP2	0.4	mediatorcomplexsubunit13-like
CFD	0.4	complementfactorD(adipsin)
RPS20	0.4	ribosomalproteinS20
RAMP2	0.4	receptor(Gprotein-coupled)activitymodifyingprotein2
RPS28	0.4	ribosomalproteinS28
LIPE	0.4	lipase,hormone-sensitive
CYB5R3	0.4	cytochromeb5reductase3
HRASLS3	0.4	phospholipaseA2,groupXVI
C19orf55	0.4	chromosome19openreadingframe55

Для валидации данных микрочипового анализа, был проведен количественный анализ мРНК 23 генов с помощью ПЦР в режиме реального времени (таблица 2).

Таблица 2.

Обозначение гена	Микрочип	ПЦР	p-value
SPP1	6.9	7.12±3.28	0.012
MMP9	4.2	6.68±2.95	0.019
CTSS	2.6	2.72±0.90	0.041
CD163	2.2	2.12±0.48	0.028
CCR7	2.06	2.71±0.59	0.034
SFRP4	1.91	2.19±0.54	0.034
DKK3	1.9	1.73±0.24	0.010
AQP3	1.9	2.36±0.50	0.023
CTSL1	1.6	1.62±0.31	0.050
CD44	1.5	1.35±0.20	0.158
NRF1	1	1.03±0.08	0.875
ATGL	0.81	0.86±0.08	0.084
GAPDH	0.81	1.11±0.12	0.754
AQP7	0.73	0.82±0.06	0.008
PLAT	0.73	0.74±0.09	0.019
LEP	0.73	0.84±0.12	0.158
CIDEA	0.69	0.79±0.09	0.028
CD36	0.68	1.00±0.08	0.638
RARRES2	0.65	0.74±0.06	0.003
CES1	0.63	0.78±0.12	0.028
RBP4	0.54	0.88±0.14	0.158
SAA1	0.5	0.98±0.19	0.480
LHS	0.38	0.83±0.09	0.071

Показана высокая корреляция между данными микрочипового анализа и ПЦР ($R^2 = 0.9198$). Анализ обнаружил 1014 индуктивных и 1245 репрессирующих транскриптов, включающих 691 ген (509 индуцирующих и 182 репрессирующих), уровень экспрессии которых изменился более чем в 1,5 раза.

Как показано в таблице 3, по результатам анализа IPA, наиболее значимый патологический процесс - метаболизм глицеролипидов, - 73 % регулирующих генов которого являются репрессирующими.

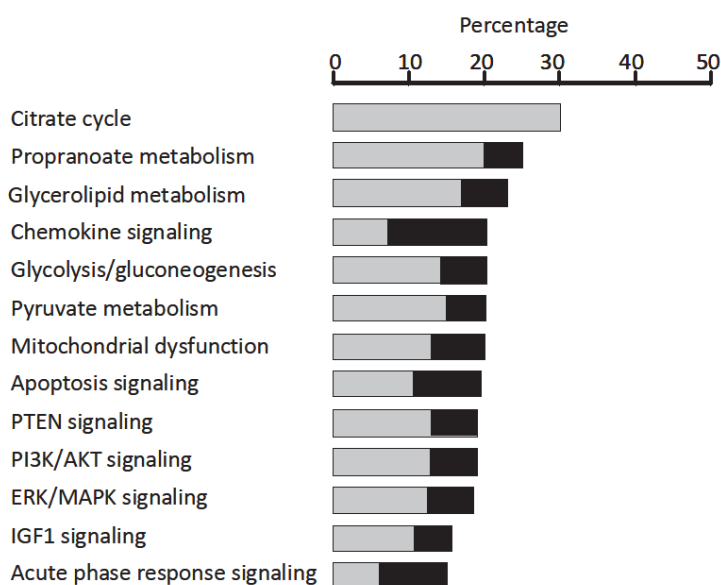
Таблица 3. Биологические процессы, обусловленные различными генами

Патологический путь	Репрессирующие гены	Индукцирующие гены	Связанные гены	p-value
Glycerolipidmetabolism	16	6	96	0.002
Mitochondrial dysfunction	17	9	130	0.002
Propanoatemetabolism	13	3	64	0.005
Glycolysis/gluconeogenesis	13	6	90	0.008

PI3K/AKTsignaling	16	6	127	0.010
PTENsignaling	13	5	100	0.013
ERK/MAPKsignaling	20	10	187	0.013
Citrate cycle	9	0	30	0.014
Apoptosissignaling	10	7	87	0.019
Chemokinesignaling	5	10	71	0.020
Pyruvatemetabolism	11	4	73	0.020
Acutephaseresponsesignaling	12	15	173	0.026
IGF-1signaling	12	4	95	0.036

Другие четыре важные метаболические процессы - обмен пропаноата, гликолиз/глюконеогенез, цитратный цикл и обмен пирувата, - в составе регулирующих генов имеют 81%, 68%, 100% и 73% репрессирующих генов, как показано на рисунке 4.

Рисунок 4.



База IPA также показала перечень из митохондриальных нарушений и 4-х сценариев нарушений трансдукции, которые более чем на 2/3 регулируются репрессирующими генами, и преимущественно регулирующий индуцирующими генами синтез хемокинов. Процесс апоптоза и синтез белков острой фазы в перечне регулирующих генов имеют почти равное количество положительных и отрицательных связей (41% и 55% соответственно).

Изменения индуцированного изопротеренолом высвобождения глицерина в ЖТЯБО вызванные сеансами механического массажа

Базальное высвобождение глицерина во время инфузии раствора Рингера было постоянным все время исследования в контрольной пробе. Количество глицерина в контрольном исследовании использовались для расчета высвобождения глицерина в условиях стимуляции. Повышение высвобождения глицерина при увеличении концентрации изопротеренола, было отмечено до процедур (рисунок 2). После процедуры, эти показатели были оставались более высокими по меньшей мере 24 часа после массажа. Средние значения вызванного изопротеренолом высвобождения глицерина (в концентрациях 1 и 10 ммоль) были достоверно выше по сравнению со значениями перед процедурой массажа (рисунок 2).

Изменения индуцированного изопротеренолом высвобождения глицерина в ЖТЯБО после сеансов механического массажа

Среднее соотношение концентрации этанола рассчитано как отношения концентрации этанола в диализате («на выходе») к концентрации в перфузионном растворе («на входе»), умноженное на 100, рассчитывалось для оценки изменения кровотока в жировой ткани (КЖТ), чем больше показатель, тем кровоток ниже (рисунок 3). В начальных условиях до процедур массажа, более высокое соотношение этанола показывает, что скорость кровотока в ЖТЯБО низкая.

Дозозависимое и индуцированное изопротеренолом уменьшение концентрации этанола в эксперименте объясняется увеличением вымыванием этанола из системы в ткани и вазодилатацией (уменьшением сопротивления в кровеносной системе). После механического массажа базальное соотношение этанола было достоверно уменьшено ($p < 0,05$). Кроме того, понижение соотношения концентрации этанола «на входе» к концентрации «на выходе», индуцированное изопротеренолом, было достоверно выраженной после механического массажа (рисунок 3). Это состояние было стабильным весь период инфузии изопротеренола.

Обсуждение

Основное заключение этого исследования - свидетельство того, что длительные процедуры механического массажа ягодично-бедренной области у женщин приводят к заметным изменениям в экспрессии большого количества генов, включенных в регуляцию метаболизма. Дополнительно, увеличение липолитического ответа и кровотока в жировой ткани были также показаны в сравнении с показателями полученными до процедур массажа. Жировой ткани различных локализаций присущи значительные морфологические и метаболические различия, и разное влияние на общий метаболизм.

Изучение транскриптомов широко применяется для оценки эффектов тренировок или пищевых изменений на экспрессию генов в жировой ткани^{18,28}. Влияние механическое растяжения ткани было исследовано на кардиомиоцитах²⁹ и скелетных мышцах, особенно с точки зрения упражнений³⁰, но исследований жировой ткани недостаточно. До данной работы, не было достаточно больших исследований, посвященных эффектам механического воздействия на ЖТЯБО. В настоящем исследовании, наблюдались изменения в экспрессии многочисленных генов, аналогичные тем, которые описаны при изменении пищевого рациона^{19,22,31}. Тринадцать биохимических процессов были достоверно изменены под влиянием механического массажа. Первым делом мы изучили процессы, характеризующиеся значительным дисбалансом между индуцирующими и репрессирующими генами. В их числе были 6 непосредственно связанных с метаболизмом. Четыре гена отвечали за метаболизм углеводов. Все гены (кроме двух) регулирующие гликолиз были подавлены. Эти два индуцирующих гена, кодируют фруктоза-1,6-бисфосфатазы и пируваткиназу. Все гены, относящиеся к цитратному циклу являются репрессирующими.

Другая важная часть клеточного метаболизма регулируется генами, кодирующими ферменты метаболизма глицеролипидов, в частности, триглицеридов. Три гена, регулирующие процессы ферментативного липолиза³² (LIPE, ATGL и MGL), как и два гена кодирующие ферменты, участвующие в высвобождении жирных кислот, были репрессированы. Синтез триглицеридов также регулируются многими репрессирующими генами, например, DGAT2³³. В дополнение, множество генов кодирующих белки, влияющие на синтез ацетил-коА и активированных форм жирных кислот, были репрессированы.

Репрессирующая регуляция 5 митохондриальных генов внутреннего мембранного комплекса 1, четырех генов комплекса 2, и двух генов для комплекса 4, свидетельствуют о возможности снижения выработки энергии. Ранее было обнаружено замедление метаболизма при продолжительной программе по снижению веса с уменьшением гликолиза, выделения жирных кислот¹⁹. Однако, в настоящем исследовании несколько отличаются исследуемые регулирующие гены, как и локализация подкожной жировой ткани (ранее был абдоминальный жир), и индекс массы тела (ранее были женщины с ожирением).

Также были изучены процессы с участием фосфоинозитид-3-киназы, АКТ и Pten. Эти процессы регулируются множеством генов, отвечающих за структуру мембранного или внутриклеточного аппарата передачи таких сигнальных молекул, как хемокины и тканевый фактор роста 1. Несмотря на преобладание репрессивной регуляции этих генов, доказательств биологического влияния не получено.

Роль систем ERK/MAPK в реакции на регулярное растягивание продемонстрирована на мышечных адипоцитах линии 3T3-L1³⁴. В исследовании показано, что активация систем ERK/MAPK, ослабляет экспрессию гена PPAR γ 2, приводя к подавлению дифференциации. Другим хорошо известным ингибитором адипогенеза является Wnt/ β -катенин³⁵.

С одной стороны, изменение экспрессии генов, ведущее к замедлению ERK, вместе с индуцированием антагонистов Wnt (DDK3), может свидетельствовать об увеличении адипогенеза. Но, с другой стороны, репрессирование ключевого фактора дифференциации адипоцитов PPAR γ ³⁶ затрудняет однозначное заключение относительно адипогенеза.

Глубокий массаж, как известно, приводит к модификации соединительной ткани. Как ни странно, не было обнаружено достоверного повышения процессов фиброза, несмотря на индуцирующую регуляцию синтеза фибронектина, многих пептидаз (4 металлопротеиназы регулируются индуцирующими и одна - репрессирующим механизмами), и 7 катепсинов³⁷. Для десяти изоформ коллагена показано повышение экспрессии, а 4 - понижение. Была значительно повышена экспрессия обоих изоформ тканевого фактора роста- β , но был репрессирован остеоонектин¹. Однако, когда сравнивается общее количество генов, связанных с фиброзом, из баз данных, по этим генам не наблюдается статистически значимого изменения.

Несмотря на индуцирующую регуляцию хемокинового сигнального пути, одновременно репрессируются IL-16 и SAA1, и индуцируется противовоспалительный IL-10. Ген IL-1RN кодирует антагонист рецептора IL-1, а CD163 - рецептор к белкам острой фазы, индуцируемый противовоспалительными медиаторами и подавляемый медиаторами воспаления. Эти процессы можно считать защитными реакциями жировой ткани на массаж.

В самом деле, изучение экспрессии генов не исчерпывается оценкой функционального состояния, но, что более важно, позволяет выявлять неописанные ранее процессы. Так, наиболее яркий эффект - замедление метаболизма, особенно липолитического каскада.

Прежде чем обсудить исследование влияния процедур механического массажа на жировую мобилизацию и кровоток в ЖТЯБО у женщин, необходимо учитывать несколько моментов. Жировая мобилизация зависит от скорости липолиза и кровотока в жировой ткани. В физиологических условиях, липолиз в жировой ткани регулируется эпинефрином и норэпинефрином, через стимуляцию α 2- и β -адренорецепторов на поверхности адипоцитов. Различный ответ жировой ткани различной локализации на адренергическую стимуляцию объясняется различными реакциями на α 2- и β -адреностимуляцию³⁸.

Накопление жира в ягодично-бедренной области связано с относительно низким ответом на стимуляцию катехоламинами. Повышение экспрессии α 2-адренорецепторов и сопутствующее снижение восприимчивости β -адренорецепторов, наблюдаемое при гипертрофии жировых клеток, предположительно, является физиологической адаптацией, приводящей к уменьшению липолитической активности в ягодично-бедренной области. Кроме того, ЖТЯБО характеризуется слабым кровотоком.

С учетом этого, β -адреномиметик изопротеренол предпочтительнее, чем физиологические катехоламины. В данном исследовании ставилась задача изучить предполагаемое влияние механического массажа на чувствительность к β -адреномиметикам с помощью оценки липолитической активности и изменений скорости кровотока. Как показано на рисунке 2, повышение концентрации глицерина в диализате (индуцированное изопротеренолом и дозозависимое) было выраженнее после механического массажа, что свидетельствует об усилении липолитической активности в жировой ткани, что соответствует полученным ранее результатам¹⁵. Одновременно, уменьшение концентрации этанола в диализате, свидетельствует об усилении локального крово- и лимфотока в жировой ткани. Данные на рисунке 3 показывают значительное увеличение индуцированного изопротеренолом снижения концентрации этанола после механического массажа. Таким образом, изопротеренол в большей степени проявляет вазодилаторный эффект после механического массажа. Механизм, лежащий в основе увеличения кровотока не может быть объяснен микродиализным методом, мы можем лишь интерпретировать полученные данные. Следует заключить, что оценка локального кровотока в жировой ткани данным методом (по концентрации этанола), является качественной и не позволяет определить абсолютные значения кровотока. Наконец, не следует исключать возможности, что повышение базальной и изопротеренол-индуцированной вазодилатации после процедур может

быть вызвано ангиогенезом. Изучение экспрессии генов показало, что несмотря на то, что некоторые хорошо известные вызывающие ангиогенез агенты, такие как ангиогенин, ангиопоэтин1³⁹ и лептин⁴⁰ были репрессированы, другие были заметно индуцированы (например, остеопонтин (SPP1)⁴¹. Экспрессия рецептора ангиопоэтина TIE1⁴², была репрессирована. Это показывает, что влияние механического массажа на экспрессию генов, связанных с ангиогенезом и синтезом стимулирующих ангиогенез молекул не удалось достоверно установить.

Важно, что изменения локального кровотока в жировой ткани могут влиять на концентрацию глицерина в диализате и ограничивать степень липолитической реакции^{43,44}. Воздействие изопротеренола на сосуды, вероятно, сдерживает повышение концентрации глицерина в диализате, из-за повышения вымывания его из жировой ткани. Полученные в данном исследовании результаты позволяют предположить, что механический массаж повышает липолиз и восприимчивость сосудов жировой ткани к изопротеренолу. Повышение липолитической активности жировых клеток может быть связано как с изменениями на уровне рецепторов (повышения числа β -адренорецепторов и/или их аффинности к изопротеренолу и другим миметикам), так и на пост-рецепторном уровне (повышение количества или активности протеинкиназ, триглицерид-липаз, не исключая влияние на белки, ассоциированные с жировыми каплями). Механизм передачи механического воздействия (растягивания и разминания) на тканевой уровень определить достаточно сложно. Опубликованные данные о влиянии механического воздействия на дифференцировку клеток, полученных из стволовых клеток мезенхимы^{34,45,46}, но данных по адипогенезу недостаточно. Показано, что механическое растяжение подавляет дифференцировку мышечных клеток линии 3T3-L1³⁴, и человеческих преадипоцитов клеточной линии SBSG⁴⁵. Однако, нет данных непосредственно по воздействию механической стимуляции на адипоциты или другие клетки жировой ткани.

Было бы достаточно интересно сравнить результаты, вызванные 12 процедурами механического массажа, с результатами других исследований, в которых также сообщается о повышении β -адренергической чувствительности подкожной жировой ткани абдоминальной области. Повышение липидной мобилизации было уже продемонстрировано *in situ* (также перфузией изопротеренола) у мужчин с ожирением на фоне низкокалорийной диеты^{47,48}. Повышение чувствительности к изопротеренолу также обнаружено у мужчин с ожирением после 3 месяцев тренировок⁴⁹. Другое исследование *in situ*, показывает, что 16-недельная тренировочная программа, развивающая выносливость, повышает жировую мобилизацию, индуцированную изопротеренолом и предсердным натрийуретическим гормоном в подкожной жировой ткани у молодых мужчин с избыточным весом⁵⁰. Положительный эффект длительных тренировок на восприимчивость к β -адреномиметикам был близок к обнаруженному в данном исследовании, хотя имеются различия в гендере обследуемых и локализации жировой ткани.

В заключение, данная работа установила, что процедуры механического массажа ЖТЯБО приводят к изменению экспрессии генов, отвечающих за метаболизм, но заметного влияния на экспрессию генов фиброза или апоптоза не выявлено. Показано, что метаболизм жировой ткани может быть замедлен по принципу отрицательной обратной связи в ответ на увеличение липолиза. Нет сомнений в том, что механически массаж вызывает заметное повышение функциональной активности жировой ткани, заключающееся в увеличении индуцированного липолиза и усилении кровотока. Восстановление высокой липолитической активности жировой ткани может быть важным эффектом при сочетании с физическими нагрузками, так как тренировки повышают мобилизацию жировых кислот из жировой ткани и их расщепление в мышечной. Явление пониженной метаболической активности может учитываться при составлении руководств по питанию для лиц, получающих механический массаж.

Благодарность

Благодарим Лорен Маркин (Laurent Marquigne) за техническую помощь в проведении биопсии жировой ткани. Это исследование проведено при финансовой поддержке LPG Systems, Valence, France, оказанной Клинико-исследовательскому центру Тулузы при Университетском госпитале Тулузы. Компания LPG Systems не оказывала влияния на выбор дизайн исследования, анализ и интерпретацию его результатов. Лоренс Видаль-Дюпон (Laurence Vidal-Dupont) - физиотерапевт, которые проводил

процедуры механического массажа. Натали Вигери (Nathalie Viguerie) и Макс Лафонт (Max Lafontan) принимали участие в разработке дизайна исследования и интерпретации полученных данных. Натали Виери проводила молекулярные исследования экспрессии генов и подготовила окончательную статью. Клер Талама (Claire Thalamas) проводила клинические исследования, Мари-Аделин Маркес (Marie-Adeline Marques) проводила биохимические исследования, Марион Комб (Marion Combes) и Бальбин Руссель (Balbine Roussel) выполнили анализ экспрессии генов. Все авторы прочитали и выразили согласие с написанной статьей.

Раскрытие информации

Авторы заявляют об отсутствии финансовой заинтересованности, за исключением Макса Лафонт, который оказывал консультационные услуги компании LPG Systems и участвовал в семинарах компании.

Литература

1. Manolopoulos KN, Karpe F, Frayn KN: Gluteofemoral body fat as a determinant of metabolic health. *Int J Obes (Lond)* 2010;34:949–959.
2. Van Pelt RE, Evans EM, Schechtman KB, Ehsani AA, Kohrt WM: Contributions of total and regional fat mass to risk for cardiovascular disease in older women. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002;282:E1023–1028.
3. Tanko LB, Bagger YZ, Alexandersen P, Larsen PJ, Christiansen C: Peripheral adiposity exhibits an independent dominant antiatherogenic effect in elderly women. *Circulation* 2003;107:1626–1631.
4. Ferreira I, Snijder MB, Twisk JW, van Mechelen W, Kemper HC, Seidell JC, Stehouwer CD: Central fat mass versus peripheral fat and lean mass: opposite (adverse versus favorable) associations with arterial stiffness? The Amsterdam Growth and Health Longitudinal Study. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:2632–2639.
5. Snijder MB, Visser M, Dekker JM, Goodpaster BH, Harris TB, Kritchevsky SB, De Rekeneire N, Kanaya AM, Newman AB, Tyllavsky FA, Seidell JC: Low subcutaneous thigh fat is a risk factor for unfavourable glucose and lipid levels, independently of high abdominal fat. The Health ABC study. *Diabetologia* 2005;48:301–308.
6. Rotunda AM, Suzuki H, Moy RL, Kolodney MS: Detergent effects of sodium deoxycholate are a major feature of an injectable phosphatidylcholine formulation used for localized fat dissolution. *Dermatol Surg* 2004;30:1001–1008.
7. Janke J, Engeli S, Gorzelnik K, Luft FC, Jordan J: Compounds used for ‘injection lipolysis’ destroy adipocytes and other cells found in adipose tissue. *Obes Facts* 2009;2:36–39.
8. Prado A, Andrades P, Danilla S, Leniz P, Castillo P, Gaete F: A prospective, randomized, doubleblind, controlled clinical trial comparing laserassisted lipoplasty with suction-assisted lipoplasty. *Plast Reconstr Surg* 2006;118:1032–1045.
9. Adcock D, Paulsen S, Jabour K, Davis S, Nanney LB, Shack RB: Analysis of the effects of deep mechanical massage in the porcine model. *Plast Reconstr Surg* 2001;108:233–240.
10. Benelli L, Berta JL, Cannistra C, Amram P, Benhamou G: Endermologie: humoral repercussions and estrogen interaction. *Aesthetic Plast Surg* 1999; 23:312–315.
11. Moseley AL, Esplin M, Piller NB, Douglass J: Endermologie (with and without compression bandaging) – a new treatment option for secondary arm lymphedema. *Lymphology* 2007;40:129–137.
12. Ortonne JP, Queille-Roussel C, Duteil L, Emiliozzi C, Zartarian M: Treatment of cellulite: effectiveness and sustained effect at 6 months with Endermologie demonstrated by several quantitative evaluation methods. *Nouv Dermatol* 2004;3:13–50.
13. Chang P, Wiseman J, Jacoby T, Salisbury AV, Ersek RA: Noninvasive mechanical body contouring: (endermologie) a one-year clinical outcome study update. *Aesthetic Plast Surg* 1998;22:145–153.
14. Kinney B: Endermologie® (the LPG® Technique) and cellulite: my clinical practice. *J Cutan Laser Ther* 2001;3:13–50.
15. Monteux C, Lafontan M: Use of the microdialysis technique to assess lipolytic responsiveness of femoral adipose tissue after 12 sessions of mechanical massage technique. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2008;22:1465–1470.
16. Kussmann M, Rezzi S, Daniel H: Profiling techniques in nutrition and health research. *Curr Opin Biotechnol* 2008;19:83–99.
17. Liu ET, Karuturi KR: Microarrays and clinical investigations. *N Engl J Med* 2004;350:1595–1597.
18. Viguerie N, Poitou C, Cancellato R, Stich V, Clement K, Langin D: Transcriptomics applied to obesity and caloric restriction. *Biochimie* 2005;87:117–123.
19. Capel F, Klimcakova E, Viguerie N, Roussel B, Vitkova M, Kovacicova M, Polak J, Kovacova Z, Galitzky J, Maoret JJ, Hanacek J, Pers TH, Bouloumie A, Stich V, Langin D: Macrophages and adipocytes in human obesity: adipose tissue gene expression and insulin sensitivity during calorie restriction and weight stabilization. *Diabetes* 2009; 58:1558–1567.
20. Mutch DM, Temanni MR, Henegar C, Combes F, Pelloux V, Holst C, Sorensen TI, Astrup A, Martinez JA, Saris WH, Viguerie N, Langin D, Zucker JD, Clement K: Adipose gene expression prior to weight loss can differentiate and weakly predict dietary responders. *PLoS One* 2007;2:e1344.

21. Karpe F, Fielding BA, Ilic V, Humphreys SM, Frayn KN: Monitoring adipose tissue blood flow in man: a comparison between the (133)xenon washout method and microdialysis. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002;26:1–5.
22. Capel F, Viguier N, Vega N, Dejean S, Arner P, Klimcakova E, Martinez JA, Saris WH, Holst C, Taylor M, Oppert JM, Sorensen TI, Clement K, Vidal H, Langin D: Contribution of energy restriction and macronutrient composition to changes in adipose tissue gene expression during dietary weight-loss programs in obese women. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:4315–4322.
23. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G: Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98: 5116–5121.
24. Calvano SE, Xiao W, Richards DR, Felciano RM, Baker HV, Cho RJ, Chen RO, Brownstein BH, Cobb JP, Tschoeke SK, Miller-Graziano C, Moldawer LL, Mindrinos MN, Davis RW, Tompkins RG, Lowry SF: A network-based analysis of systemic inflammation in humans. *Nature* 2005;437: 1032–1037.
25. Stich V, de Glisezinski I, Berlan M, Bulow J, Galitzky J, Harant I, Suljkovicova H, Lafontan M, Riviere D, Crampes F: Adipose tissue lipolysis is increased during a repeated bout of aerobic exercise. *J Appl Physiol* 2000;88:1277–1283.
26. Moro C, Pillard F, de Glisezinski I, Klimcakova E, Crampes F, Thalamas C, Harant I, Marques MA, Lafontan M, Berlan M: Exercise-induced lipid mobilization in subcutaneous adipose tissue is mainly related to natriuretic peptides in overweight men. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008;295:E505–513.
27. Bernst E, Gutmann I: Determination of ethanol with alcohol dehydrogenase and NAD; in Bergmeyer HU (ed): *Methods of Enzymatic Analysis*, vol 3. New York, Academic, 1974, pp 1499–1505.
28. Park SK, Prolla TA: Lessons learned from gene expression profile studies of aging and caloric restriction. *Ageing Res Rev* 2005;4:55–65.
29. Zagorski J, Obratsova M, Gellar MA, Kline JA, Watts JA: Transcriptional changes in right ventricular tissues are enriched in the outflow tract compared with the apex during chronic pulmonary embolism in rats. *Physiol Genomics* 2009;39:61–71.
30. Prokopchuk O, Liu Y, Wang L, Wirth K, Schmidtbleicher D, Steinacker JM: Skeletal muscle IL-4, IL-4Ralpha, IL-13 and IL-13Ralpha1 expression and response to strength training. *Exerc Immunol Rev* 2007;13:67–75.
31. Viguier N, Vidal H, Arner P, Holst C, Verdich C, Avizou S, Astrup A, Saris WH, Macdonald IA, Klimcakova E, Clement K, Martinez A, Hoffstedt J, Sorensen TI, Langin D: Adipose tissue gene expression in obese subjects during low-fat and highfat hypocaloric diets. *Diabetologia* 2005;48:123–131.
32. Lafontan M: Advances in adipose tissue metabolism. *Int J Obes (Lond)* 2008;32(suppl 7):S39–51.
33. Yen CL, Stone SJ, Koliwad S, Harris C, Farese RV Jr: Thematic review series: Glycerolipids. DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis. *J Lipid Res* 2008;49:2283–2301.
34. Tanabe Y, Koga M, Saito M, Matsunaga Y, Nakayama K: Inhibition of adipocyte differentiation by mechanical stretching through ERK-mediated downregulation of PPARgamma2. *J Cell Sci* 2004; 117:3605–3614.
35. Christodoulides C, Lagathu C, Sethi JK, VidalPuig A: Adipogenesis and WNT signalling. *Trends Endocrinol Metab* 2009;20:16–24.
36. White UA, Stephens JM: Transcriptional factors that promote formation of white adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol* 2010;318:10–14.
37. Spencer M, Yao-Borengasser A, Unal R, Rasouli N, Gurley CM, Zhu B, Peterson CA, Kern PA: Adipose tissue macrophages in insulin resistant subjects are associated with collagen VI, fibrosis and demonstrate alternative activation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010;299:E1016–1027.
38. Lafontan M, Langin D: Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Prog Lipid Res* 2009;48:275–297.
39. Silha JV, Krsek M, Sucharda P, Murphy LJ: Angiogenic factors are elevated in overweight and obese individuals. *Int J Obes (Lond)* 2005;29:1308–1314.
40. Bouloumie A, Drexler HC, Lafontan M, Busse R: Leptin, the product of OB gene, promotes angiogenesis. *Circ Res* 1998;83:1059–1066.
41. Cheriya V, Hussein MA: Osteopontin, angiogenesis and multiple myeloma. *Leukemia* 2005;19: 2203–2205.
42. Hato T, Tabata M, Oike Y: The role of angiopoietin-like proteins in angiogenesis and metabolism. *Trends Cardiovasc Med* 2008;18:6–14.
43. Bülow J, Madsen J: Influence of blood flow on fatty acid mobilization from lipolytically active adipose tissue. *Pflügers Arch* 1981;390:169–174.
44. Moro C, Crampes F, Sengenès C, De Glisezinski I, Galitzky J, Thalamas C, Lafontan M, Berlan M: Atrial natriuretic peptide contributes to physiological control of lipid mobilization in humans. *FASEB J* 2004;18:908–910.
45. Hossain MG, Iwata T, Mizusawa N, Shima SW, Okutsu T, Ishimoto K, Yoshimoto K: Compressive force inhibits adipogenesis through COX-2-mediated down-regulation of PPARgamma2 and C/EBPalpha. *J Biosci Bioeng* 2010;109:297–303.
46. Kook SH, Son YO, Choi KC, Lee HJ, Chung WT, Hwang IH, Lee JC: Cyclic mechanical stress suppresses myogenic differentiation of adult bovine satellite cells through activation of extracellular signal-regulated kinase. *Mol Cell Biochem* 2008; 309:133–141.
47. Barbe P, Stich V, Galitzky J, Kunesova M, Hainer V, Lafontan M, Berlan M: In vivo increase in betaadrenergic lipolytic response in subcutaneous adipose tissue of obese subjects submitted to a hypocaloric diet. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:63–69.
48. Sengenès C, Stich V, Berlan M, Hejnova J, Lafontan M, Pariskova Z, Galitzky J: Increased lipolysis in adipose tissue and lipid mobilization to natriuretic peptides during low-calorie diet in obese women. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002;26:24–32.

49. Stich V, de Glisezinski I, Galitzky J, Hejnova J, Crampes F, Riviere D, Berlan M: Endurance training increases the beta-adrenergic lipolytic response in subcutaneous adipose tissue in obese subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1999;23:374–381.
50. Moro C, Pillard F, De Glisezinski I, Harant I, Riviere D, Stich V, Lafontan M, Crampes F, Berlan M: Training enhances ANP lipid-mobilizing action in adipose tissue of overweight men. *Med Sci Sports Exerc* 2005;37:1126–1132.