

the mitochondrial uncoupling proteins *UCP2* and *UCP3* / M.D. Brand, T.C. Esteves // *Cell metabolism*. – 2005. – Т. 2. – №. 2. – P.85-93.

6. Cannon B. Brown adipose tissue: function and physiological significance / B. Cannon, J.A.N. Nedergaard // *Physiological reviews*. – 2004. – Т.84. – №.1. – P.277-359.

7. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men / W.D. van Marken Lichtenbelt [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 2009. – Т.360. – №.15. – P.1500-1508.

8. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source / S. Gesta [et al.] // *Cell*. – 2007. – Т.131. – №.2. – P.242-256.

9. Enerbäck S. The origins of brown adipose tissue / S. Enerbäck // *New England Journal of Medicine*. – 2009. – Т.360. – №19. – P.2021-2023.

10. High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity / M. Saito [et al.] // *Diabetes*. – 2009. – Т.58. – №.7. – P.1526-1531.

11. Identification of a variant associated with

adult-type hypolactasia / N.S. Enarrah [et al.] // *Nature Genet*. – 2002. –30. –P.233-237.

12. Loss of *UCP2* impairs cold-induced non-shivering thermogenesis by promoting a shift toward glucose utilization in brown adipose tissue / A. Caron [et al.] // *Biochimie*. – 2017. – Т. 134. – P.118-126.

13. Nedergaard J. Uncoupling proteins: current status and therapeutic prospects: Meeting on Uncoupling Proteins / J. Nedergaard, D. Ricquier, L.P. Kozak // *EMBO reports*. – 2005. – Т.6. – №.10. – C. 917-921.

14. Population genetic analysis of the uncoupling proteins supports a role for *UCP3* in human cold resistance / A.M. Hancock [et al.] // *Mol Biol Evol*. –2011. –№1. –P.601-614.

15. Schrauwen P. Putative function and physiological relevance of the mitochondrial uncoupling protein-3: involvement in fatty acid metabolism? / P. Schrauwen, J. Hoeks, M.K.C. Hesselink // *Progress in lipid research*. – 2006. – Т.45. – №.1. – P.17-41.

16. Tam C.S. Brown adipose tissue: mecha-

nisms and potential therapeutic targets / C.S. Tam, V. Lecoultré, E. Ravussin // *Circulation*. – 2012. – Т. 125. – №. 22. – P.2782-2791.

17. The expression of *UCP3* directly correlates to *UCP1* abundance in brown adipose tissue / K.E. Hilse [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. – 2016. – Т.1857. – №.1. – P.72-78.

18. The 1000 Genomes Project Consortium. A global reference for human genetic variation // *Nature*. 2015. V. 526. P. 68–74. doi 10.1038/nature15393

19. Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia / C. Fleury [et al.] // *Nature genetics*. – 1997. – Т.15. – №.3. – P.269.

20. Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression / O. Boss [et al.] // *FEBS letters*. – 1997. – Т. 408. – №. 1. – P.39-42.

21. *UCP3* and its putative function: consistencies and controversies / M.E. Harper [et al.] // *Biochem Soc Trans*. – 2001. – №6. – P.768-73.

А.Т. Дьяконова, Н.И. Павлова, Н.А. Соловьева,
Н.П. Филиппова, В.В. Додохов, Л.М. Неустроева,
М.А. Варламова, Х.А. Куртанов

ПОЛИМОРФИЗМ RS738409 ГЕНА АДИПОНУТРИНА (*PNPLA3*) СРЕДИ КОРЕННЫХ ЖИТЕЛЕЙ СЕВЕРА

DOI 10.25789/YMJ.2018.62.14
УДК 575.176

С целью выявления неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП) был изучен полиморфизм rs738409 гена адипонутрина (*PNPLA3*) среди коренных жителей Севера в Республике Саха (Якутия). Эпидемиологические данные свидетельствуют о частом сочетании СД 2 типа и НАЖБП, характеризующейся накоплением липидов как в самих гепатоцитах, так и в межклеточном пространстве. В последнее время большое значение придается генетической обусловленности НАЖБП.

Ключевые слова: сахарный диабет 2-го типа, инсулинорезистентность, ген адипонутрина, полиморфизм.

In order to detect non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) we studied polymorphism rs738409 of adiponutrin gene (*PNPLA3*) among native northerners in the Sakha (Yakutia) Republic.

Epidemiological data indicate the frequent combination of type 2 diabetes and NAFLD, characterized by accumulation of lipids both in the hepatocytes themselves and in the intercellular space. Recently, great importance is attached to the genetic conditionality of NAFLD.

Keywords: diabetes mellitus type 2, insulin resistance, adiponutrin gene, polymorphism.

Введение. Проблема адаптации к условиям Севера активно изучается в мире. Достижения отечественной науки связаны с выявлением физиологических, психических, биохимических особенностей организма, коренных различий в состоянии организма северян и жителей средних широт. К

настоящему времени является установленным фактом, что при адаптации человека к экстремальным природным условиям Севера происходит перестройка всех видов обмена белков, жиров, углеводов, витаминов, макро- и микроэлементов. Под постоянным воздействием низких температур, организм человека нуждается в высоком уровне энергетического обмена, который в свою очередь сопровождается значительным потреблением липидов.

Метаболизм организма переходит на качественно новый уровень гомеостаза, отличающийся большим использованием на энергетические нужды жиров и белков и меньшим использованием углеводов.

Высококалорийное питание, избыточное потребление (насыщенных) жиров коррелируют с увеличением массы тела и ожирением, а в последнее время выявлена их связь с неалкогольной

жировой болезнью печени (НАЖБП), которая характеризуется накоплением липидов как в самих гепатоцитах, так и в межклеточном пространстве, ассоциируется с ожирением, метаболическим синдромом и сахарным диабетом 2-го типа (СД 2) и относится к наиболее часто встречающимся хроническим заболеваниям печени [1-2].

Пациенты с сахарным диабетом 2-го типа инсулинорезистентны (ИР), часто страдают ожирением, имеют дислипидемию и повышенную активность печеночных ферментов, для них характерна тенденция к накоплению жира в печени независимо от индекса массы тела (ИМТ), тем самым они имеют более высокий риск развития тяжелого заболевания печени по сравнению с пациентами без диабета [3]. В последнее время большое значение придается генетической обусловленности НАЖБП. Выделяется значение

ФГБНУ «ЯНЦ КМП»: ДЬЯКОНОВА Александра Тимофеевна – м.н.с., dyakonova@bk.ru, ПАВЛОВА Надежда Ивановна – к.б.н., вед.н.с.-руковод. лаб., solnishko_84@inbox.ru, СОЛОВЬЕВА Наталья Алексеевна – к.м.н., с.н.с., sonata608@yandex.ru, ФИЛИППОВА Наталья Павловна – к.б.н., доцент, с.н.с., inniah1970@list.ru, ДОДОХОВ Владимир Владимирович – к.б.н., н.с., НЕУСТРОЕВА Лена Михайловна – м.н.с., ВАРЛАМОВА Марина Алексеевна – м.н.с., КУРТАНОВ Харитон Алексеевич – к.м.н., гл.н.с.-руковод. отдела, hariton_kurtanov@mail.ru.

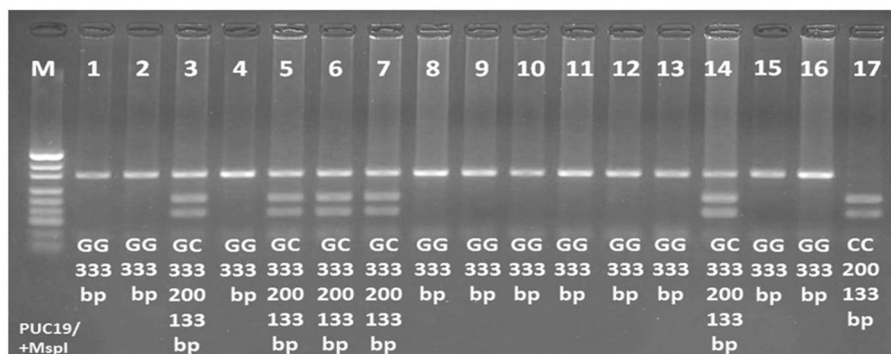
гена *PNPLA3*, кодирующего синтез белка-фермента адипонутрина.

Полногеномный поиск ассоциаций (GWAS) показал, что SNP в гене *PNPLA3* влияют на уровни ферментов печени в плазме. Аллель G полиморфизма rs738409 гена *PNPLA3* сильно связан с НАЖБП, а также с увеличением показателей АСТ и АЛТ, уровня ферритина и стадии фиброза у пациентов с НАЖБП [4]. С целью выяснить генетический фон НАЖБП в якутской популяции пациентов, страдающих СД 2-го типа, в настоящей работе проведен анализ полиморфизма rs738409 гена *PNPLA3*.

PNPLA3 в основном экспрессируется в печени и обладает липазной активностью триацилглицерина. Мутация I148M связана со сниженной активностью триглицерид-липазы, как показано в исследованиях с рекомбинантным белком *PNPLA3*. Это приводит к накоплению триглицеридов в клетках печени, но уменьшает выделение липопротеинов очень низкой плотности (VLDL) в кровообращение. Сниженные концентрации липидов в крови могут уменьшить осаждение липидов в стенке кровеносных сосудов. Происходит естественная реакция организма на холод, так называемая «периферическая вазоконстрикция», которая заключается в том, чтобы сохранить (поддержать) внутреннюю температуру тела с помощью сужения кровеносных сосудов.

Материал и методы исследования. Экспериментальная часть работ по генотипированию полиморфизма rs738409 гена *PNPLA3* была проведена в лаборатории наследственной патологии отдела молекулярной генетики Якутского научного центра комплексных медицинских проблем (ЯНЦ КМП). Для исследования использованы образцы ДНК из коллекции биоматериала ЯНЦ КМП (УНУ «Геном Якутии», рег. №USU_507512). В исследовании участвовали коренные жители Севера, живущие в РС(Я). Исследование проводили с письменного согласия участников. Протестировано 153 образца ДНК пациентов с диагнозом СД 2-го типа, 105 из которых принадлежал женщинам, 48 – мужчинам. Группой сравнения служила выборка из 84 здоровых добровольцев, мужчин (n=26) и женщин (n=58).

Критериями включения в исследование были: отсутствие поражения печени хроническими вирусными гепатитами; у всех исследуемых были исключены: аутоиммунный гепатит, первичный билиарный холангит, пер-



Электрофореграмма продукта амплификации участка гена *PNPLA3* в 4%-ном агарозном геле. 17 – генотип CC, 3, 5, 6, 7, 14 – генотип GC, 1, 2, 4, 8, 9, 10, 12, 13, 15, 16 – генотип GG. M – маркер PUC19/+Msp.bp – пар оснований

вичный склерозирующий холангит, наследственный гемохроматоз, болезнь Вильсона–Коновалова; отсутствие злоупотребления алкоголем (> 30 г/л).

Выделение ДНК из лимфоцитов периферической крови проводилось стандартным методом фенольно-хлороформной экстракции. Однонуклеотидный полиморфизм (SNP) I148M (rs738409) определяли с помощью ПЦР-ПДРФ метода.

Амплификация области гена, содержащего полиморфный вариант, проводилась стандартными парами праймеров (форвард праймер: 5'-TGGGCTGAAGTCCGAGGGT-3' и реверс праймер: 5'-CCGACACCAGTGCCCTGCAG-3') (ООО «Биотех-Индустрия», г. Москва) для анализа полиморфизма rs738409. Состав реакционной смеси для ПЦР (общий объем реакционной смеси – 25 мкл): 13 мкл ddH₂O, 2,5 мкл 10xПЦР буфер, 2,5 мкл 25 mM MgCl₂, 2,5 мкл 2,5 mM dNTP Mix, 1,5 мкл (10 pmol/мкл) каждого олигонуклеотидного праймера, 0,3 ед. (1,5 ед.) «hotstart» Taq-полимеразы и 3 мкл ДНК. ПЦР проводили в термощелке MJ Mini Gradient Thermal Cycler («BioRad»).

Температурные условия ПЦР были следующими: 95°C – 5 мин, затем 37 циклов при 94°C – 30 с, 66°C – 30 с и 72°C – 40 с и заключительная элонгация при 72°C – 5 мин. Затем продукты ПЦР разрезали с помощью рестриктазы BstF5 I (ООО «СибЭнзим», г. Новосибирск) в течение 16 ч при 65°C. Разрезанные ПЦР-продукты подвергали горизонтальному электрофорезу в 1,5%-ных агарозных гелях, окрашенных этидием бромидом, в буфере 1xTBE при 120В в течение 1 ч и визуализировали с использованием геледокументирующей системы («Vilber Lourmat», Франция).

Детекция ПДРФ продуктов проводилась с помощью горизонтального электрофореза в пластине 4%-ного

агарозного геля, окрашенного бромистым этидием, с использованием стандартного трис-ацетатного буфера при 120В в течение 1 ч. Визуализацию рестрикционных продуктов проводили в UV-лучах с использованием геледокументирующей системы («Vilber Lourmat», Франция) (рисунок).

Интерпретация результатов генотипирования была выполнена на основе различных шаблонов бэндов: CC генотип 200 и 133 п.н., CG генотип – 333, 200 и 133 п.н., GG генотип – 333 п.н.

Статистический анализ полученных результатов исследования был проведен с помощью программ: OfficeMicrosoftExcel 2010, Statistica 8.0. Распределение генотипов по исследованным полиморфизмам проверяли на соответствие равновесию Харди-Вайнберга (PXB) с помощью точного теста Фишера. Для сравнения частоты аллелей между различными группами использовали критерий χ^2 с поправкой Йетса на непрерывность. Ожидаемую гетерозиготность рассчитывали по Nei. Результаты считались значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Анализ распределения частоты аллелей и генотипов полиморфного варианта гена *PNPLA3* (rs738409) в группе больных СД 2-го типа и здоровых не выявил достоверных отличий, в обеих группах преобладал аллель G ($p < 0,001$) и гомозиготный генотип GG. У исследованных мужчин обеих групп аллель G достоверно преобладал над аллелем C ($p < 0,05$) (табл.1).

Выявленная высокая частота аллеля G полиморфизма rs738409 гена *PNPLA3*, ассоциированного с накоплением жира в печени, в изученных выборках, возможно, связана с приспособительными качествами организма к экстремальным природным условиям Севера. Известно, что жирные кислоты, поступая в кровяное русло, попадают в печень и мышцы, где ос-

Таблица 1

Распределение частоты аллелей и генотипов полиморфизма rs738409 гена *PNPLA3*

	n		Генотип, %			Аллель		χ^2	p
			CC	CG	GG	C	G		
	Больные СД 2								
Женщины	105	Н	8,57	30,48	60,95	0,238	0,762	2,688	0,101
		О	5,67	36,28	58,05				
Мужчины	48	Н	16,67	25,00	58,33	0,292	0,708	7,488	0,006
		О	8,51	41,32	50,17				
Здоровые									
Женщины	58	Н	6,90	36,21	56,90	0,250	0,750	0,069	0,793
		О	6,25	37,50	56,25				
Мужчины	26	Н	23,08	15,38	61,54	0,308	0,692	10,613	0,001
		О	9,47	42,60	47,93				

новным энергетическим источником служит гликоген. Воздействуя на процесс распада гликогена, они действуют как фактор разобщения окисления и фосфорилирования, вызывая меньший конечный выход АТФ и больший конечный выход тепла. По данным проекта «1000 геномов» в Азии высокая частота аллеля G встречается у японцев (42,3%). В своих исследованиях японской популяции больных СД 2-го типа М. Ueyama, N. Nishida [8] и Н. Кан с соавт. [5] отмечают высокую частоту аллеля G (48-48,8%). Низкая частота аллеля G отмечается среди афроамериканцев, в популяции она составляла 19%, среди больных СД 2 – 13,7% [7].

При сравнении средних значений биохимических показателей крови у носителей различных генотипов гена *PNPLA3* (rs738409) в группе больных СД 2 типа выявили повышенный уровень триглицеридов, глюкозы натощак и гликированного (гликозилированного) гемоглобина, остальные показатели были в пределах нормы (табл. 2).

В исследованной выборке диабетиков наиболее высокое содержание триглицеридов в крови выявлено у носителей генотипа GG по сравнению с носителями генотипов CC и CG, что

согласуется с полученными данными в исследованиях Jean-Michel Petit и соавт. [7], которые обнаружили связь полиморфизма *PNPLA3* rs738409 с содержанием жира в печени независимо от общего и висцерального ожирения и резистентности к инсулину. Они полагают, что адипонутрин может быть важным ключом к пониманию механизмов, связанных с различием между жировой печенью и жировой печенью без метаболических последствий, таким образом накопление жира в печени может быть метаболически доброкачественным.

Заключение. В результате исследования гена *PNPLA3* у якутов с СД 2-го типа установлено, что распределение частоты аллелей и генотипов гена *PNPLA3* (rs738409) находится в соответствии с законом Харди-Вайнберга. У больных СД 2-го типа обнаружена высокая частота аллеля G (69,5-74,7%) с преобладанием генотипа GG (55,8-58,2%).

Таким образом, установлено, что частота мутантного аллеля функционального полиморфизма rs738409 гена *PNPLA3* выше, чем в других известных мировых популяциях. Нормально функционирующий белок гена *PNPLA3* регулирует активность триглицерид-

ной гидролазы и ацилтрансферазы лизофосфатидной кислоты. Следовательно, можно предположить, что высокая частота мутантного аллеля G полиморфизма I148M гена *PNPLA3* у якутов с СД 2-го типа может являться адаптацией организма к низким температурам. Изучение гена адипонутрина может быть важным ключом к пониманию механизмов адаптации к низким температурам метаболических процессов у коренного населения Севера.

Литература

1. Бирюкова Е.В. Сахарный диабет 2-го типа и неалкогольная жировая болезнь печени – болезни современности / Е.В. Бирюкова, С.В. Родионова // Медицинский альманах. – 2017. – № 6 (51). – С.130-135.
2. Biryukova E.V. Diabetes mellitus type 2 and non-alcoholic fatty liver disease are diseases of the present / E.V. Biryukova, S.V. Rodionova // Medical almanac. – 2017. – № 6 (51). – P.130-135.
3. Исследование ассоциации полиморфизма гена *PNPLA3* с неалкогольной жировой болезнью печени в узбекской популяции / М.М. Каримов, Д.А. Далимова, Г.Н. Собирова [и др.] // Евразийский журнал внутренней медицины. – 2015. – № 02 (02). – С.25-27.
4. Association of *PNPLA3* gene polymorphism with non-alcoholic fatty liver disease in the Uzbek population / M.M. Karimov, D.A. Dalimova, G.N. Sobirova [et al.] // Eurasian Journal of Internal Medicine. – 2015. – №02 (02). – P.25-27.
5. Association of *PNPLA3* SNP rs738409 with liver density in africanamericans with type 2 diabetes mellitus / A.J. Cox, M.R. Wing, J.J. Carr, [et al.] Diabetes & metabolism. 2011. – Vol. 37, №5. – P.452-455. doi:10.1016/j.diabet.2011.05.001.
6. Association of the rs738409 polymorphism in *PNPLA3* with liver damage and the development of nonalcoholic fatty liver disease / K. Hotta, M. Yoneda, H. Hyogo [et al.] // BMC Med. Genet. – 2010. – Vol. 11. – P.172.
7. Kan H. Influence of the rs738409 polymorphism in patatin-like phospholipase 3 on the treatment efficacy of non-alcoholic fatty liver disease with type 2 diabetes mellitus / H. Kan, H. Hyogo, H. Ochi // Hepatol Res. – 2016. – Vol.46–E146–E153. doi: 10.1111/hepr.12552.
8. Costs and consequence associated with newer medications for glycemic control in type 2 diabetes / A. Sinha, M. Ragan, T. Hoerger [et al.] // Diabetes Care. – 2010. – Vol. 33. – P. 695–700.
9. Specifically *PNPLA3*-Mediated Accumulation of Liver Fat in Obese Patients with Type 2 Diabetes / J.-M. Petit, B. Guin, D. Masson, L. [et al.] // The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. – 2010. – Vol. 95. – №12. – P.E430–E436 https://doi.org/10.1210/jc.2010-0814
10. The impact of *PNPLA3* and *JAZF1* on hepatocellular carcinoma in non-viral hepatitis patients with type 2 diabetes mellitus / M. Ueyama, N. Nishida, M. Korenaga [et al.] // J Gastroenterol. – 2015. – Vol.51(4). – 370-9. doi: 10.1007/s00535-015-1116-6. Epub 2015 Sep 3.
11. Association of *PNPLA3* with non-alcoholic fatty liver disease in a minority cohort: the Insulin Resistance Atherosclerosis Family Study / L.E. Wagenknecht, N.D. Palmer, D.W. Bowden [et al.] // Liver international: official journal of the International Association for the Study of the Liver. – 2011. – Vol.31(3). – P.412-416. doi:10.1111/j.1478-3231.2010.02444.x.
12. http://www.internationalgenome.org/

Таблица 2

Средние клинические показатели больных СД 2 типа в зависимости от генотипа

Показатель	CC (n=16)	CG (n=40)	GG (n=78)	Норма
Холестерин, ммоль/л	5,38±0,37	4,96±0,73	5,04±0,52	в пределах 3,2-5,6
Триглицериды, ммоль/л	2,04±0,31	1,71±0,59	2,32±0,11	в пределах 0,41-1,8
ЛПВП, ммоль/л	1,17±0,08	1,32±0,45	1,33±0,40	0,78-1,81
ЛПНП, ммоль/л	2,89±0,32	3,02±0,87	2,86±0,59	1,71-3,5
АСТ, Ед/л	18,82±1,83	21,53±0,48	19,70±0,39	Женщины – менее 31 Мужчины – менее 37
АЛТ, Ед/л	20,38±3,42	22,69±0,57	22,86±0,32	Женщины – менее 34 Мужчины – менее 45
АСТ/АЛТ	1,11±0,15	1,04±0,39	0,97±0,53	0,91-1,75
Нб. А 1с, %	8,48±0,56	8,34±0,59	8,71±0,55	4-6,2 %
Общий билирубин, мкмоль/л	9,47±1,09	9,41±0,62	10,15±0,26	3,4-17,1
Глюкоза натощак, ммоль/л	8,51±0,96	8,84±0,76	9,19±0,53	3,89-5,83