

И.П. КАЙДАШЕВ, А.М. РАСИН,
О.А. ШЛЫКОВА, И.М. ГОРБАСЬ, И.П. СМИРНОВА,
А.В. ПЕТРУШОВ, М.С. РАСИН

Украинская медицинская стоматологическая академия,
Полтава

E-mail: shimmy41@yandex.ru

ЧАСТОТА Про12Ала- ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА PPAR γ В УКРАИНСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ И ЕГО ВОЗМОЖНАЯ СВЯЗЬ С РАЗВИТИЕМ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА



Впервые изучено распространение полиморфизма Про12Ала у 39 здоровых и 42 лиц мужского пола 40–65 лет с явлениями метаболического синдрома в украинской популяции. Установлена частота аллеля 12Ала – 27,9 %, генотипа Про12Ала – 32,6 %, Ала12Ала – 4,4 %, что близко к результатам, найденным в чешской популяции. У лиц с метаболическим синдромом частота аллеля 12Ала достоверно меньше – 18,4 %, что соответствует ранее установленным данным у больных сахарным диабетом 2-го типа. Найдена тенденция к увеличению индекса массы тела у лиц с аллелем 12Ала в группе больных с явлениями МС.

© И.П. КАЙДАШЕВ, А.М. РАСИН, О.А. ШЛЫКОВА,
И.М. ГОРБАСЬ, И.П. СМИРНОВА, А.В. ПЕТРУШОВ,
М.С. РАСИН, 2007

Введение. Метаболическим синдромом (МС) принято называть комплекс расстройств, включающий артериальную гипертензию (АГ), дислипидемию атерогенного типа, центральное (абдоминальное) ожирение и резистентность тканей к инсулину [1]. Последняя проявляется гиперинсулинемией на ранних этапах развития процесса, далее нарушением толерантности к углеводам и, наконец, развитием сахарного диабета 2-го типа (СД-2). Ожирение считается инициальным, а инсулинорезистентность (ИР) – центральным патогенетическим фактором МС, поэтому ИР используется в качестве синонима МС.

Метаболический синдром является предиктором (доклинической фазой) атеросклероза и тесно связан с риском развития макрососудистых его осложнений. Поскольку АГ и атеросклероз остается ведущей причиной инвалидизации и смертности населения развитых стран, большое внимание уделяется изучению этиологии и патогенеза МС, включающего существенные генетические компоненты (мультифакторные, полигенные заболевания) [2].

Рецепторы, активирующие пролиферацию пероксисом* (peroxysome proliferator-activated receptors, PPAR γ) – ядерные транскрипционные факторы из семейства ядерных гормональных рецепторов. Они управляют активностью генов ключевых ферментов жирового и углеводного обмена, т.е. энергетического гомеостаза организма, и осуществляют связь между факторами внешней среды и обменными процессами. Из трех типов этих рецепторов (PPAR α , β/d и γ) наибольшее внимание привлекают PPAR γ , поскольку их фармакологические агонисты – тиазолидинедионы (ТЗД) – значительно повышают чувствительность тканей к инсулину, преодолевают ИР, т.е. воздействуют на центральный механизм развития МС. Полиморфизм PPAR γ позволяет глубже исследовать их роль в патологии [3].

Идентифицировано несколько генетических вариантов PPAR γ . Редкие мутации в лиганд-связывающем домене рецептора приво-

* Термин «PPAR» не имеет физиологического смысла, так как у человека эти ядерные транскрипционные факторы никак не связаны с пролиферацией пероксисом, однако он прочно закрепился в мировой литературе, поэтому вряд ли целесообразно менять его на иную аббревиатуру (Прим. автора).

дят к развитию тяжелого МС с развитием особой формы парциальной липодистрофии, резистентной АГ, раннего атеросклероза и тяжелого СД-2. Найдены мутации, ведущие к ожирению в определенных этнических группах. Несколько генетических вариантов найдено во второй изоформе – PPAR γ 2, преимущественно локализованной в жировой ткани и моноцитах. Она имеет дополнительную цепочку, состоящую из 28 аминокислот, и этим отличается от PPAR γ 1. Наиболее частым вариантом является замена ССА на GCA в 12-м кодоне экзона В, приводящем к замене пролина на аланин в молекуле рецептора (Про12Ала-полиморфизм). Этот полиморфизм достаточно широко распространен в европейских и североамериканской белой популяциях, достигая 12–20 %. Многочисленные исследования демонстрируют взаимосвязь между Про12Ала-полиморфизмом и изменениями индекса массы тела, чувствительностью тканей к инсулину и риском развития СД-2. Существуют большие различия между отдельными расовыми и этническими группами в частоте этого полиморфизма [4].

В Украине распространение Про12Ала-полиморфизма и его возможная связь с развитием МС не изучены. В предыдущих наших исследованиях получены данные об определенных отличиях украинской популяции от других европейских популяций в распространении полиморфизма рецептора ангиотензина II первого типа, связанного с развитием одного из компонентов МС – артериальной гипертензии [5].

Целью настоящего исследования явилось изучение распространения Про12Ала-полиморфизма PPAR γ 2 в украинской популяции, его связи с развитием МС и возможности использования этих данных для формирования групп риска.

Материалы и методы. Изучали частоту Про12Ала-полиморфизма в двух группах мужчин в возрасте 40–65 лет, средний возраст 51 ± 4 года. Группа наблюдения состояла из 42 больных терапевтического и пульмонологического отделений 1-й городской клинической больницы г. Полтавы, у которых отмечалось сочетание повышенного индекса массы тела (ИМТ) > 30 кг/м², АГ (А/Д $> 140/90$ мм рт. ст.), общего холестерина $> 6,2$ ммоль/л, холестерина ЛПВП $< 1,30$ ммоль/л и триглицеридов плаз-

мы крови $> 1,8$ ммоль/л, что соответствует модифицированным критериям МС Американской ассоциации сердца и легких [6]. Контрольную группу, состоящую из 39 мужчин той же возрастной группы с нормальным ИМТ, А/Д и уровнем липидов крови, отобрали случайным образом из когорты 250 обследованных жителей Полтавщины при эпидемиологическом исследовании. Липиды и глюкозу крови определяли стандартными методами.

Геномную ДНК из венозной крови обследуемых выделяли фенол-хлороформным методом. Полиморфный участок гена PPAR γ 2 амплифицировали с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в 50 мкл среды, содержащей 67 мМ трис-НСl, рН 8,8, 16,6 мМ сульфата аммония, 0,01 % твин-20, 2 мМ хлорида магния, 0,2 мМ dNTP, по 1 мкМ каждого из праймеров PPAR γ 2 – прямого 5'-CAAGC-CCAGTCCTTTCTGTG-3' и обратного – 5'-CAGGAAACAGCTATGACCAGTGAAG-GAATCGCTTTCCG-3', 2,5 ед. ДНК полимеразы Taq, 50–100 нг геномной ДНК. ПЦР проводили на амплификаторе «Терцик» (ДНК-Технология, Россия) по следующей программе: денатурация при 94 °С 3 мин 1 цикл, 34 цикла: 94 °С – 30 с, 56 °С – 30 с, 72 °С – 30 с и заключительный цикл 72 °С – 7 мин.

Продукты амплификации инкубировали с рестриктазой Bst FN 1 (НПО «Сибэнзим», Новосибирск) в буфере Y (33 мМ трис-ацетат рН 7,9; 10 мМ ацетат магния, 66 мМ ацетат калия; 1 мМ MDDT) в течение 12 ч при 60 °С. Продукты расщепления разделяли с помощью электрофореза в 2 %-ном агарозном геле, который окрашивали бромистым этидиумом [7].

Результаты генетического анализа обработаны статистически с помощью критерия χ^2 и определения достоверности точным методом Фишера. Достоверность различий между остальными показателями в группах оценивали с помощью t-критерия.

Результаты исследований и их обсуждение. В изученной нами популяционной выборке у лиц без явлений МС преобладает аллель 12Про (72,5 %) и гомозиготы Про12Про (25 человек). Аллель 12Ала (27,5 %) был найден у 12 человек, из них у двух в форме гомозигот (табл. 1). Распределение частот аллелей соответствовало закону Харди-Вайнберга.

Значительное преобладание генотипа Про12Про характерно для всех популяций. Как видно из представленных в табл. 1 данных, значительные различия в распространении аллеля 12Ала отмечаются в различных расовых и этнических группах. Наибольшее распространение аллель 12Ала имеет в европейской и североамериканской белой популяциях, наименьшее — у китайцев.

В других европейских популяциях частота аллеля 12Ала колеблется в пределах 12–20 %, тогда как у самоанцев — 8 %, японцев — 4 %, наурицианцев — 2 % (цит. по [8]). Таким образом, европеоиды (*Caucasian*) являются группой с наибольшей частотой аллеля 12Ала. В украинской популяции, как и в чешской, величины несколько превышают средние показатели европейских популяций. Во всех популяциях частота гомозигот невелика (1–6 %), что затрудняет анализ влияния аллеля 12Ала на физиологические и патофизиологические процессы.

В группе больных с явлениями МС также преобладает генотип Про12Про (32 человека), существенно меньше носителей аллеля 12Ала

(8 человек) и 2 человека с генотипом Ала12Ала. В табл. 2 представлены собственные данные в сопоставлении с данными литературы о различиях в распределении частот аллелей в группах больных с явлениями МС. В американской и чешской популяциях группы МС представлены больными СД-2.

Как следует из сравнения данных табл. 1 и табл. 2, в контрольных группах всех трех популяций частота аллеля 12Ала была достоверно выше, чем в группах больных с явлениями МС. В украинской популяции в группе больных с явлениями МС достоверно выше число лиц с генотипом Про12Про, меньше гетерозигот и меньше общее число носителей аллеля Ала ($\chi^2 = 10,55, p < 0,01$).

В мировой литературе накоплен и проанализирован значительный материал, касающийся роли 12Ала-полиморфизма в развитии СД-2 [8]. Метаанализ показывает уменьшение риска заболевания СД-2 у носителей аллеля Ала на 25 % [11]. Наши данные указывают на ту же тенденцию у лиц с МС без (до) развития СД-2.

Таблица 1

Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов гена PPAR γ 2 в различных популяциях, %

Генетический маркер/группа	Украинцы (собственные данные) <i>n</i> = 46	Американцы, европеоиды [9] <i>n</i> = 577	Коренные американцы (цит. по [8])	Чехи [10] <i>n</i> = 118	Китайцы (цит. по [8])
Про12Про	63,0 (29)	75,5	90	62,8	99
Про12Ала	32,6 (15)	23,0	9,0	30,5	1
Ала12Ала	4,4 (2)	1,5	1,0	6,7	0
Про	72,1	80,0	90,8	71,5	99,9
Ала	27,9	20,0	9,2	28,5	0,01

Таблица 2

Анализ распределения частот встречаемости аллелей и генотипов гена PPAR γ 2 в группах пациентов с проявлениями метаболического синдрома, % (количество лиц)

Генетический маркер	Украинцы <i>n</i> = 49	Американцы, европеоиды <i>n</i> = 312	Чехи <i>n</i> = 73
Про12Про	79,9 (39)	80,7 (252)	74,4 (54)
Про12Ала	16,3* (8)	18,6* (58)	23,3* (17)
Ала12Ала	3,8 (2)	0,7 (2)	2,3 (2)
Про	82,6	83,7	79,2
Ала	18,4*	16,3*	20,8*

* Различия с соответствующими показателями в табл. 1 значимы ($p < 0,05$)

Таблица 3

Анализ зависимости некоторых компонентов метаболического синдрома от полиморфизма гена PPAR γ 2

Показатель	12Про		12Ала	
	Контроль (n = 25)	МС (n = 32)	Контроль (n = 12)	МС (n = 8)
Средний возраст, годы	49 ± 2,1	51 ± 2,3	51 ± 2,8	54 ± 3,1
Индекс массы тела, кг/м ²	21 ± 3,1	32 ± 2,0*	22 ± 1,2	37 ± 2,1**
Артериальное давление, мм рт. ст.				
систолическое	117 ± 3,5	165 ± 4,1*	122 ± 3,0	175 ± 4,6*
диастолическое	74 ± 2,3	107 ± 3,0*	77 ± 5,2	110 ± 4,0*
Общий холестерин, ммоль/л	4,84 ± 0,14	5,87 ± 0,16*	5,2 ± 0,32	6,22 ± 0,21*
Холестерин ЛПВП, ммоль/л	1,69 ± 0,12	1,29 ± 0,21*	1,84 ± 0,22	1,41 ± 0,24*
Триглицериды, ммоль/л	1,38 ± 0,11	2,26 ± 0,23*	1,46 ± 0,22	2,34 ± 0,14*
Глюкоза крови натощак, ммоль/л	3,4 ± 0,38	6,6 ± 0,38*	3,6 ± 0,24	5,9 ± 0,82*

*Различия с показателем в контрольной группе значимы ($p < 0,001$). **Различия между показателями в группах больных с явлениями МС в форме тенденции ($p < 0,1$).

Вопрос о том, каков молекулярный механизм влияния PPAR γ 2 на развитие МС, остается открытым. МС является комплексным расстройством энергетического гомеостаза. Большой приток высококалорийных продуктов на фоне низких энергозатрат и постоянного стресса способствует аккумуляции триглицеридов в жировой ткани с увеличением числа и объема адипоцитов. Гипертрофированная жировая ткань продуцирует избыток цитокинов провоспалительного и гипертензивного характера, что приводит к гипертензии, дислипидемии и развитию воспалительных изменений в сосудистой стенке. Процессы адипогенеза, пути циркуляции липопротеидов и продукция адипоцитокинов контролируются PPAR (в самой жировой ткани и накапливающихся в ней моноцитах исключительно PPAR γ 2). От активности этих рецепторов зависит, в частности, уровень циркулирующих свободных жирных кислот (СЖК), повышение которого считается причиной развития инсулинорезистентности, т.е. МС и его «конечной точки» СД 2. Таким образом, PPAR γ 2 является молекулой, занимающей центральное место в патогенезе МС [12].

Исследования на экспериментальных моделях с удалением гена PPAR γ показали, что имеется определенный интервал в активности рецептора, в пределах которого идут нормальные процессы жирового и углеводного обмена. Полная или значительная дезактивация рецеп-

тора приводит к парциальной липодистрофии и развитию тяжелого МС, как это наблюдается у лиц с мутациями в лиганд-связывающем домене PPAR γ 2. Чрезмерная активность при других мутациях приводит к ожирению, но без развития МС. Стимуляция PPAR γ тиазолидинонами также вызывает небольшое увеличение жировой ткани, но одновременно преодолевает ИР и способствует ликвидации основных симптомов МС [13].

12Ала-полиморфизм касается изменения лиганд-независимой транскрипционной активности PPAR γ 2. Это может способствовать более низкой секреции жировой тканью СЖК, меньшей степени ИР и, таким образом, оказывать протективный эффект в отношении развития МС [8].

С целью проанализировать зависимость отдельных компонентов МС от генотипа мы изучили распределение компонентов МС в контрольной группе и у больных с явлениями МС.

Как следует из табл. 3, средние показатели АД и липидов крови у лиц с различными генотипами как в контрольных группах, так и у больных с явлениями МС статистически не отличались. Единственным отличием является несколько больший ИМТ у лиц с аллелем 12Ала, не достигающий, однако, уровня достоверности, т.е. можно говорить лишь о тенденции к увеличению массы тела у носителей аллеля 12Ала. Средние величины (кроме глю-

kozy) у больных с явлениями МС были несколько выше. Если при дальнейшем накоплении материала эта тенденция подтвердится, можно будет говорить о протективном эффекте аллеля 12Ала в группах с более выраженными явлениями МС.

Выводы. В украинской популяции нами впервые найдено значительное распространение аллеля 12Ала (27,4 %), несколько превышающее средние показатели среди европейцев (12–20 %) и близкое к показателям в чешской популяции. В группе больных с явлениями МС частота аллеля 12Ала достоверно меньше (18,4 %), что соответствует данным, полученным у большого числа больных СД-2. Найдена тенденция к более высокому ИМТ в группе больных с явлениями МС-носителей аллеля 12Ала. Полученные данные свидетельствуют о большей вероятности развития МС у лиц с генотипом Про12Про и могут быть в дальнейшем использованы для целей профилактики. Требуется дальнейших исследований молекулярный механизм влияния PPAR γ 2 на развитие МС.

SUMMARY. Frequency of the Pro12Ala gene polymorphism PPAR γ 2 has been studied in 39 healthy men and 42 men with metabolic syndrome (MS) of the age of 40–65 years in Ukrainian population. The frequencies were 27,9 % for 12Ala allele, 32,6 % for Pro12Ala, and 4,4 % for Ala12Ala that is close to the results of estimation of Czech population. The frequency of 12Ala allele was significantly less – 18,4 % ($p < 0,05$) in the persons with MS that corresponds to the pre-established information concerning the patients with diabetes of the 2nd type. A tendency has been detected to the increase of the body mass index in patients with 12Ala allele in the metabolic syndrome group.

РЕЗЮМЕ. Вперше вивчено розповсюдження поліморфізму Про12Ала у 39 здорових і 42 осіб чоловічої статі 40–65 років з явищами метаболічного синдрому в українській популяції. Встановлено частоту алеля 12Ала – 27,9 %, генотипу Про12Ала – 32,6 %, Ала 12Ала – 4,4 %, що близьке до результатів, знайдених в чеській популяції. У осіб з метаболічним синдромом частота алеля 12Ала достовірно менше – 18,4 %, що відповідає раніше встановленим даним у хворих на цукровий діабет 2-го типу. Знайдено тенденцію до збільшення індексу маси тіла в осіб з алелем 12Ала в групі хворих з явищами метаболічного синдрому.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Reaven G.M.* Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease // *Diabetes*. – 1988. – **37**. – P. 1595–1607.
2. *Isomaa B., Almgren P., Tuomi T et al.* Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome // *Diabet. Care*. – 2001. – **24**. – P. 683–689.
3. *Desvergne B., Wahli W.* Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism // *Endocr. Rev.* – 1999. – **20**. – P. 649–688.
4. *Gurnell M., David B., Savage V., Krishna K. et al.* The metabolic syndrome: peroxisome proliferator-activated receptor γ and its therapeutic modulation // *Clin. Endocr. and Metab.* – 2003. – **88**, № 6. – P. 2412–2421.
5. *Кайдашев И.П., Расин М.С., Савченко Л.Г.* Полиморфизм рецептора ангиотензина II первого типа у больных эссенциальной гипертензией в украинской популяции // *Цитология и генетика*. – 2005. – **39**, № 5. – С. 51–55.
6. *Lenfant C.* Definition of metabolic syndrome: report of the national heart, lung, and blood institute / Amer. Heart ass. conf. on scientific issues related to definition // *Circulation*. – 2004. – **109**. – P. 433–438.
7. *Malecki T.M., Fray J., Klupa T.* The Pro12Ala polymorphism of PPAR γ 2 gene and susceptibility to type 2 diabetes mellitus in a Polish population // *Diabetes Res. Clin. Pract.* – 2003. – **62**, № 2. – P. 105–111.
8. *Stumvoll M., Haring H.* Peroxisome proliferator-activated receptor – [gamma] Pro12Ala polymorphism – perspectives in diabetes // *Diabetes*. – 2002. – **8**. – P. 43–54.
9. *Mori H., Ikegami H., Kawaguchi Y., Seine S.* Pro12 \rightarrow Ala substitution in PPAR gamma: is associated with resistance to development of diabetes in the general population: possible involvement in impairment of insulin secretion in individuals with type 2 diabetes // *Diabetes*. – 2001. – **50**. – P. 891–894.
10. *Pinterova D., Cerna M., Kolostova K. et al.* The frequency of alleles of the Pro12Ala polymorphism in PPARgamma2 is different between healthy controls and patients with type 2 diabetes // *Folia Biol (Praha)*. – 2004. – **50**, № 5. – P. 153–156.
11. *Altshuler D., Hirschhorn J.N., Klannemark M. et al.* The common PPARgamma Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes // *Nat. Genet.* – 2000. – **26**. – P. 76–80.
12. *Desvergne B., Michalik L., Wahli W.* Be Fit or Be Sick: Peroxisome proliferator-activated receptors are down the road // *Mol. Endocr.* – 2004. – **18**, № 6. – P. 1321–1332.
13. *Walczak R., Tontonoz P.* PPARadigms and PPARadoxes: expanding roles for PPAR γ in the control of lipid metabolism // *J. Lipid Res.* – 2002. – **43**. – P. 177–186.

Поступила 10.10.06