

## ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬ К РАЗВИТИЮ ИНСУЛИНОРЕЗИСТЕНТНОСТИ В КЫРГЫЗСКОЙ ЭТНИЧЕСКОЙ ГРУППЕ

*Ч.Б. Молдокеева, О.С. Лунегова, А.А. Алдашев, Э.М. Миррахимов*

Выявлено, что носительство Т677 аллели полиморфизма гена метилентетрагидрофолат редуктазы ассоциируется с наличием инсулинорезистентности, абдоминального ожирения, гипертриглицеридемией и снижением уровня холестерина липопротеинов высокой плотности.

*Ключевые слова:* инсулинорезистентность; С677Т полиморфизм; метилентетрагидрофолат редуктазы; сахарный диабет.

В настоящее время одним из факторов развития сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) является гомоцистеин (ГЦ) [1]. Регуляция концентрации ГЦ в сыворотке крови осуществляется при помощи фермента метилентетрагидрофолатредуктазы (МТГФР).

Фермент МТГФР является катализатором внутриклеточной реакции образования 5-метилтетрагидрофолата, который необходим для восстановления ГЦ до метионина. Снижение активности данного фермента, часто обусловленное мутациями в гене МТГФР, приводит к нако-

плению ГЦ в крови [3]. В настоящее время выявлено несколько полиморфизмов в гене МТГФР, из которых наиболее важным в клиническом отношении является С677Т полиморфизм, который приводит к образованию термолabileного фермента и нарушению реакции метилирования ГЦ, что сопровождается увеличением концентрации ГЦ в крови [5,11].

В то же время гипергомоцистеинемия часто сочетается с наличием инсулинорезистентности (ИР) и сахарным диабетом (СД) 2 типа, однако характер этой ассоциации полностью не изучен.

У пациентов с СД 2 типа при сочетании с гипергомоцистеинемией в несколько раз увеличивается риск развития коронарной болезни сердца (КБС), мозгового инсульта, чаще возникают сосудистые осложнения – заболевания периферических сосудов, нефропатия, ретинопатия и др [10]. Взаимосвязь С677Т полиморфизма гена МТГФР и ИР в настоящее время недостаточно изучена. В популяции кыргызов изучение роли данного полиморфизма в развитии СД 2 типа и метаболического синдрома (МС) вообще не проводилось. Вышеизложенные причины обосновали выбор темы настоящего исследования.

Цель: выявить ассоциацию между С677Т полиморфизмом гена МТГФР и наличием инсулинорезистентности у кыргызов.

#### Материал и методы

В исследование было включено 264 пациента кыргызской национальности, из которых с ИР составило 132 пациента (57 женщин, 75 мужчин) в возрасте от 35 до 75 лет (средний возраст  $52,3 \pm 8,1$  лет). Среди них у 74 отмечалось наличие СД 2 типа. Группу контроля составили 132 пациента сходных по полу и возрасту без ИР, СД 2 типа и МС.

Всем пациентам было проведено клиническое исследование, включающее сбор жалоб, анамнеза, объективное обследование с измерением артериального давления, антропометрических показателей (вес, рост, окружность талии (ОТ) и бедер (ОБ)), высчитывался индекс массы тела (ИМТ) по формуле:  $\text{ИМТ} = \text{вес (кг)} / \text{рост (м)}^2$ ; отношение ОТ/ОБ. Ожирением считалось увеличение  $\text{ИМТ} \geq 30 \text{ кг/м}^2$ .

Для проведения генетического анализа и определения биохимических показателей производился забор крови натощак. Определялся сахар плазмы крови, инсулин, общий холестерин (ОХС), триглицериды (ТГ), холестерин липопротеинов высокой плотности (ЛПВП-ХС) сыворотки крови по стандартной методике. Содержание холестерина липопротеинов низкой плотности (ЛПНП-ХС) высчитывалось по формуле Friedwald W [8]. Индекс ИР НОМА высчитывался по формуле:  $\text{НОМА} = (\text{инсулин сыв. крови (}\mu\text{IU/ml)} \times \text{сахар плазмы (ммоль/л)}) / 22,5$ . ИР считалось состояние при значении индекса НОМА 2,77 и выше. Диагноз МС выставлялся согласно модифицированным критериям АТР III (2005 г) [6]. Диагноз КБС выставлялся на основании общепринятых клинико-инструментальных критериев [12].

#### Выделение ДНК и генетический анализ

ДНК выделялась из клеток крови с использованием набора для экстракции ДНК Nucleon

ВАССЗ (“Amersham Pharmacia Biotech”, Швеция). Определение полиморфизма гена С677Т МТГФР осуществлялось с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) на амплификаторе “Hybaid” с использованием специфических праймеров (F-TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA и R-AGGACGGTGCAGGTGAGAGTG (фирмы “Sigma”, США) с последующей рестрикцией полученных ПЦР продуктов ферментом HinfI (Promega, США). В результате рестрикции образовывались рестрикционные фрагменты: СС 198 п.н.; ТТ 175+23 п.н., СТ 198+175+23 п.н., которые разделялись с помощью электрофореза в 3%-м агаровом геле. Сканирование геля и анализ полученных результатов осуществлялся на имидж-денситометре Fluor-S Multimager (“Bio-Rad”, США).

**Статистическая обработка** данных проводилась с помощью программы приложения Microsoft – Statistica 7.0 и пакета стандартных программ PRIZM 5. Для определения наличия взаимосвязи между переменными проводился  $\chi^2$  тест. Для установления достоверности различий при сравнении результатов для переменных с нормальным распределением использовался t-критерий Стьюдента, а для переменных с непараметрическим распределением – Mann-Whitney U test. Критерием статистической достоверности считалось значение  $p < 0,05$ .

#### Результаты

Исследуемые группы по возрасту и полу не различались (табл.1).

Как и ожидалось, у пациентов с ИР достоверно чаще встречались факторы риска (ФР), связанные с МС, такие как ожирение (и соответственно показатели ИМТ, ОТ), артериальная гипертензия (АГ) с уровнем систолического артериального давления (САД) и диастолического артериального давления (ДАД), а также гипертриглицеридемия и пониженный уровень ЛПВП-ХС. Количество пациентов с отягощенной наследственностью по ССЗ и курением достоверно в обеих группах не отличались.

При генетическом исследовании была выявлена четкая ассоциация между ИР и носительством мутантной аллели. ( $\chi^2_{\text{генотип}} - 7,22, p - 0,027$ ;  $\chi^2_{\text{аллель}} - 7,33, p - 0,0068$ , ОШ – 1,68, 95%ДИ (1,13–2,5)) (рис. 1). Такая же взаимосвязь отмечалась между исследуемым полиморфизмом и абдоминальным ожирением ( $\chi^2_{\text{генотип}} - 7,25, p - 0,027$ ;  $\chi^2_{\text{аллель}} - 5,99, p - 0,014$ ), гипертриглицеридемией ( $\chi^2_{\text{генотип}} - 6,8, p - 0,033$ ;  $\chi^2_{\text{аллель}} - 5,42, p - 0,02$ ) и сниженным уровнем ЛПВП-ХС ( $\chi^2_{\text{генотип}} - 7,31, p - 0,026$ ;  $\chi^2_{\text{аллель}} - 7,57, p - 0,006$ ).

Таблица 1

Сравнительная характеристика обследованных пациентов

Показатель	ИР (n=132)	Контроль (n=132)	p
Возраст, лет	52,3±8,1	52,8±8,6	нд
АГ; n (%)	94 (71,2)	42 (31,8)	<0,00001
СД 2 типа; n (%)	74(56,1)	0	<0,00001
Ожирение; n (%)	75 (56,8)	17 (12,9)	<0,00001
ИМТ; кг/м <sup>2</sup>	30,1±4,3	25,8±3,4	<0,00001
ОТ, см	101,1±10,8	87,5±9,6	<0,00001
Курение; n (%)	23 (17,4)	23 (17,4)	нд
ОН по ССЗ; n (%)	38 (28,8)	31 (24,6)	нд
ОХС; ммоль/л	5,1±0,95	5,2±1,17	нд
ЛПВП-ХС; ммоль/л	0,95±0,29	1,26±0,34	<0,00001
ЛПНП-ХС; ммоль/л	3,27 ± 0,25	3,29± 0,84	нд
ТГ; ммоль/л	2,6±1,81	1,19 ± 0,54	<0,00001
КБС; n (%)	36 (28,4)	10 (7,6)	<0,00001

АГ – артериальная гипертензия, ОН – отягощенная наследственность; ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания, нд – недостоверно.

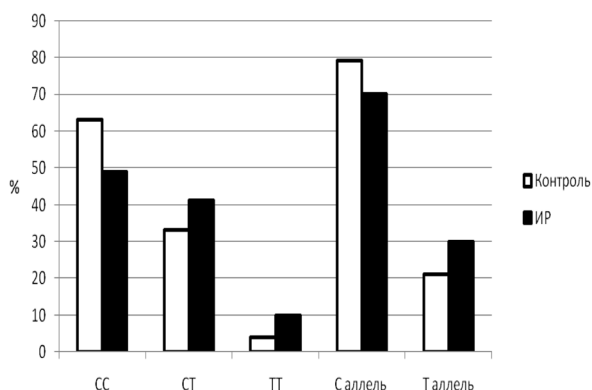


Рис. 1. Ассоциация С677Т полиморфизма гена МТГФР с ИР.

$\chi^2$ генотип=7,22,  $p=0,027$ ;  $\chi^2$ аллель=7,33,  $p=0,0068$ . ОШ 1,68,95% ДИ (1,13–2,5). ДИ – доверительный интервал, ОШ – отношение шансов.

Для оценки влияния различных генотипов на факторы риска липидных показателей, показателей углеводного обмена все исследуемые лица были разбиты на три группы в зависимости от генотипа.

При анализе факторов риска у обследованных лиц с различными генотипами по встречаемости АГ (соответственно уровни САД и ДАД), курения и отягощенной наследственности статистически значимой разницы выявлено не было (рис. 2). Ожирение достоверно чаще встречалось у носителей ТТ и СТ генотипа по сравнению с группой СС генотипа. При наличии мутантной

аллели также достоверно увеличивались показатели ИМТ (30,1±5,0 в группе ТТ против 28,5±4,4 в группе СТ против 27,3±4,3 в группе СС генотипа  $P_{СС-СТ}<0,05$ ;  $P_{СС-ТТ}<0,05$ ), ОТ (100,6±12,1 в группе ТТ генотипа против 96,4±12,9 в группе СТ генотипа против 92,8±11,8 в группе СС генотипа  $P_{СС-СТ}<0,05$ ;  $P_{СС-ТТ}<0,05$ ), ОТ/ОБ (0,96±0,05 в группе ТТ против 0,93±0,1 в группе СТ против 0,91±0,09 в группе СС генотипа  $P_{СС-СТ}<0,05$ ;  $P_{СС-ТТ}<0,05$ ), что свидетельствует о преобладании абдоминальной формы ожирения. Количество пациентов с СД 2 типа во всех трех группах было сопоставимо. Число пациентов с ИР было достоверно выше среди носителей ТТ генотипа.

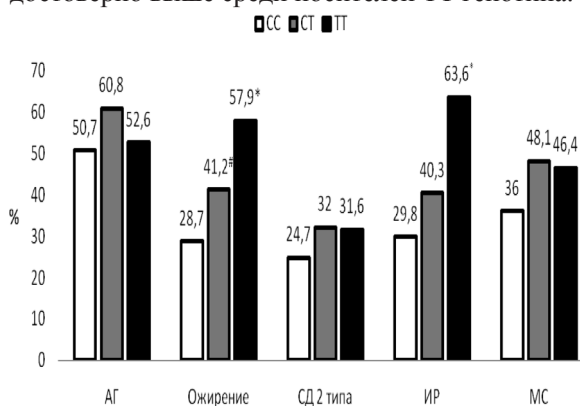


Рис. 2. Факторы риска у пациентов с различными генотипами.

АГ – артериальная гипертензия # $P_{СС-СТ}<0,05$ ; \* $P_{СС-ТТ}<0,05$ .

Липидный спектр и показатели углеводного обмена у пациентов с различными генотипами

Показатель	Генотипы		
	СС (n=149)	СТ (n=97)	ТТ (n=18)
ОХС; ммоль/л	5,2±1,03	5,08±1,15	5,3±1,02
ЛПНПХС; ммоль/л	3,31±0,87	3,19±0,93	3,4±0,91
ЛПВП-ХС ммоль/л	1,14±0,35	1,08±0,37	0,91±0,2**
ТГ; ммоль/л	1,67±1,14	2,11±1,9 <sup>#</sup>	2,46±1,82**
сахар; ммоль/л	6,47±2,6	6,99±2,84	6,49±1,77
инсулин; $\mu$ U/ml	9,42±7,7	10,7±10,4	12,3±5,6
НОМА	2,5±2,2	2,95±2,85	3,28±1,76

<sup>#</sup> $p_{CC-ST} < 0,05$ ; \*\* $p_{CC-TT} < 0,01$

Анализ липидного спектра показал тенденцию к повышению уровня ТГ в группе ТТ-генотипа и достоверно более низкий уровень ЛПВП-ХС в этой же группе (табл 2). При анализе результатов углеводного обмена отмечено, что показатели сахара и инсулина не различались в трех группах, показатель индекса НОМА нарастал в группах от СС к ТТ генотипу, и у носителей ТТ генотипа превышал 2,77.

#### Обсуждение

Результаты данного исследования выявили наличие взаимосвязи между ИР и С677Т полиморфизмом гена МТГФР. Известно, что при данном полиморфизме отмечается аминокислотная замена аланина на валин в позиции 222 (участок, отвечающий за связывание с фолатом), что приводит к образованию термолабильного фермента метилентетрагидрофолат редуктазы и снижению его активности, что в конечном итоге ведет к избыточному накоплению ГЦ в сыворотке крови [2,5].

Взаимосвязь С677Т полиморфизма гена МТГФР с ИР в настоящее время является дискуссионной. Инсулин является одним из регуляторов концентрации ГЦ в сыворотке крови. Считается, что в нормальных условиях инсулин регулирует реакцию транссульфирования цистагон- $\beta$ -синтазы, ключевого фермента регулирующего катаболизм ГЦ в печени, и снижает концентрацию ГЦ в сыворотке крови [9]. Однако при развитии ИР отмечено повышение концентрации ГЦ в крови, несмотря на развивающуюся гиперинсулинемию в крови. Назначение инсулинсинтетайзеров одновременно с понижением концентрации инсулина приводит к снижению концентрации ГЦ в крови [7]. Предыдущими исследованиями была выявлена взаи-

мосвязь изучаемого полиморфизма и гипергомоцистеинемии с наличием ожирения [4], который, как известно, является пусковым механизмом в развитии ИР. Однако вопрос о том, повышает ли ИР гомоцистеин в сыворотке крови, или, наоборот, приводит ли гипергомоцистеинемия к развитию ИР, остается спорным.

В нашем исследовании была выявлена ассоциация С677Т с абдоминальной формой ожирения, гипертриглицеридемией и снижением уровня ЛПВП-ХС.

Возможно, выявленная нами ассоциация между С677Т полиморфизмом гена МТГФР и ИР, а также взаимосвязь этого полиморфизма с липидными нарушениями связана с более частым развитием ожирения у носителей 677Т аллеля.

Таким образом, отмечена достоверная взаимосвязь между носительством Т677 аллели гена МТГФР и ИР. Наличие мутантной аллели также ассоциировалось с такими показателями МС, как абдоминальное ожирение, гипертриглицеридемией и сниженным уровнем ЛПВП-ХС.

#### Литература

1. Баранова Е.И. Клиническое значение гомоцистеинемии (обзор литературы) / Е.И. Баранова, О.О. Большакова // Артериальная гипертензия. 2004. Т.10. № 1.
2. Полиморфизм генов фолатного обмена и болезни человека / И.Н. Фетисова, А.С. Добролюбов, М.А. Липин, А.В.Поляков // Вестник новых медицинских технологий. 2007. Т. X. № 1. С. 91–96.
3. Строгий В.В. Генетические аспекты предрасположенности к атеросклерозу в детском и подростковом возрасте / В.В. Строгий // Медицинский журнал. 2006. № 4.

4. Are genetic variants of the methyl group metabolism enzymes risk factors predisposing to obesity / I. Terruzzi, P. Senesi, I. Fermo et al. // *J Endocrinol Invest*. 2007. Vol. 30. P. 747–753.
5. Biological and clinical implications of the MTHFR C677T polymorphism / P.M. Ueland, S. Hustad, J. Schneede, H. Refsum, S.E. Volset // *Trends Pharmacol Sci*. 2001. Vol. 22. P. 195–201.
6. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung and Blood Institute scientific statement / Grundy S.M., Cleeman J.I., Daniels S.R. et al. // *Curr Opin Cardiol*. 2006. Vol. 21. P.1–6.
7. Effects of a high-fat-sucrose diet on enzymes in homocysteine metabolism in the rat. / Fonseca V., Dicker-Brown A., Ranganathan S. et al. // *Metabolism*. 2000. Vol. 49. P.736–741.
8. Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge / W.T. Friedewald, R.I. Levy, D.S. Fredrickson // *Clin. Chem*. 1972. Vol.18. P.499–502.
9. Hormonal regulation of cystathionine-beta-synthase expression in liver / Ratnam S., Maclean K.N., Jacobs R.L. et al. // *J Biol Chem*. 2002. Vol. 277. P. 42912–42918.