

ВЗАИМОСВЯЗЬ TRP64ARG ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА β 3-АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ С ОЖИРЕНИЕМ И ДИСЛИПИДЕМИЕЙ В ГРУППЕ ЭТНИЧЕСКИХ КЫРГЫЗОВ

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

Изучены распространенность Arg64 аллели Trp64Arg полиморфизма гена β 3АР в группе этнических кыргызов и ассоциация с ожирением, сахарным диабетом 2 типа, артериальной гипертензией и дислипидемией.

Ключевые слова: метаболический синдром; β -адренорецепторы; Trp64Arg полиморфизм; абдоминальное ожирение; дислипидемия.

В настоящее время во всем мире отмечается увеличение распространенности ожирения и сахарного диабета (СД) 2 типа [1], которые в совокупности с артериальной гипертензией, дислипидемией и инсулинорезистентностью составляют метаболический синдром (МС) [2]. Известно, что в развитии ожирения и СД 2 типа играют роль как генетические, так и внешние причины, в последние годы повышенный интерес вызывают генетические факторы.

В 1995 г. Walston J. с соавт. [3] выявили точечную мутацию возможного кандидата гена β 3-адренорецепторов (β 3АР). β 3АР – это связанные с G-протеином трансмембранные рецепторы, расположенные в бурой и белой жировой ткани и принимающие участие в регуляции теплообразования и липолиза у грызунов [4]. Стимуляция β 3АР в экспериментальных иссле-

дованиях сопровождалась антидиабетическим эффектом [5].

Указанная мутация гена β 3АР является результатом замены триптофана на аргинин в 64 позиции (Trp64Arg полиморфизм) последовательности аминокислот. В проведенных клинических исследованиях у гомозиготных носителей Arg64 аллели среди представителей различных этнических групп были выявлены раннее появление СД 2 типа и ожирения [6,7], увеличение индекса массы тела (ИМТ) [8] и гиперинсулинемия [9].

В кыргызской популяции исследований Trp64Arg полиморфизма гена β 3АР ранее не проводилось. Целью настоящей работы было изучение распространенности Arg64 аллели Trp64Arg полиморфизма гена β 3АР в группе этнических кыргызов и возможной ассоциации с метаболи-

ческими нарушениями: ожирением, СД 2 типа, артериальной гипертензией и дислипидемией.

Материал и методы. В исследование включались этнические кыргызы старше 30 лет. Всем пациентам было проведено общеклиническое обследование, включившее сбор жалоб, анамнеза, антропометрию, измерение систолического (САД) и диастолического (ДАД) артериального давления (АД). Антропометрическое обследование состояло в измерении роста (см), массы тела (кг), окружности талии (ОТ, см), бедер (ОБ, см) и подсчете ИМТ, который рассчитывался как отношение веса (кг) к росту (м²). АД измерялось стандартным сфигмоманометром в положении обследуемого сидя, после 10-минутного отдыха.

Лабораторные исследования включали анализ сахара капиллярной крови натощак, липидного спектра (общий холестерин (ОХ), триглицериды (ТГ), холестерин липопротеинов высокой плотности (ЛВП-ХС), холестерин липопротеинов низкой плотности (ЛНП-ХС)) и инсулина сыворотки крови. Забор крови осуществлялся из локтевой вены обследуемого утром натощак, после 12 ч. голода. Определение липидного спектра проводилось на биохимическом анализаторе “Sinchron CX4-DELTA” (“Beckman”, США). Концентрация ЛНП-ХС рассчитывалась по формуле Friedwald W. [10]. Индекс инсулинорезистентности НОМА высчитывался по формуле: $\text{НОМА} = \frac{\text{инсулин сыворотки крови } (\mu\text{IU/ml}) \times \text{сахар плазмы (ммоль/л)}}{22,5}$. За инсулинорезистентность принимались состояния при индексе $\text{НОМА} \geq 2,77$.

Диагноз МС уточнялся согласно модифицированным критериям, предложенным Американской Ассоциацией Сердца (АТР III, 2005 г.), при наличии: абдоминального ожирения (АО) (ОТ у мужчин ≥ 102 см, у женщин ≥ 88 см); АД $\geq 130/85$ ммHg, либо приеме гипотензивных средств; ЛВП-ХС $< 1,03$ ммоль/л у мужчин и $< 1,3$ у женщин, или приеме препаратов, повышающих концентрацию ЛВП-ХС; ТГ $\geq 1,7$ ммоль/л, или приеме препаратов, снижающих уровень ТГ; сахара крови $\geq 5,6$ ммоль/л, или приеме гипогликемических средств [2]. МС устанавливался при наличии 3 из 5 вышеуказанных критериев.

ДНК выделялась из клеток крови с использованием набора для экстракции геномной ДНК Nucleon BACC3 (“Amersham Pharmacia Biotech”, Швеция). Определение полиморфизма гена $\beta 3\text{AP}$ осуществлялось с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) на амплификаторе “Hybaid” с использованием специфических праймеров (F–CGCCCAATACCGCCAACAC и

R–3 CCACCAGGAGTCCCATCACC) с последующей рестрикцией полученных ПЦР продуктов ферментом BstOI (Promega, США). В результате рестрикции образовывались фрагменты: Arg64Arg 161 п.н.; Trp64Arg 161+99+62 п.н.; Trp64Trp 99+62 п.н.; которые разделялись с помощью электрофореза в 3%-м агарозном геле. Сканирование геля и анализ полученных результатов осуществлялся на имидж-денситометре Fluor-S Multimager (“Bio-Rad”, США). Все пациенты дали письменное информированное согласие на участие в исследовании.

Статистическая обработка полученных данных проводилась с помощью программы STATISTICA 6,0 и пакета стандартных программ PRIZM 5. Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение для переменных с нормальным распределением.

Результаты. Обследовано 213 (145 мужчин) этнических кыргызов от 30 до 73 ($50,7 \pm 7,6$) лет. Всем пациентам был определен Trp64Arg полиморфизм гена $\beta 3\text{AP}$ и изучена встречаемость различных генотипов и аллелей гена $\beta 3\text{AP}$. Частота Arg аллели составила 0,239 (0,269 и 0,176 у мужчин и женщин соответственно). Генотипы гена $\beta 3\text{AP}$ распределились следующим образом: 54,5%, 43,2% и 2,3% для Trp64 гомозигот, Trp64Arg гетерозигот и Arg64 гомозигот соответственно (табл. 1).

Таблица 1

Распределение генотипов и частота аллелей

| | n (муж/жен) | % |
|-------------------|-------------|-------|
| Частота генотипов | | |
| Trp/Trp | 116 (70/46) | 54,5 |
| Trp/Arg | 92 (72/20) | 43,2 |
| Arg/Arg | 5 (3/2) | 2,3 |
| Частота аллелей | | |
| Trp64 | | 0,761 |
| Arg64 | | 0,239 |

В соответствии с генотипом пациенты были распределены на 2 группы: первая – лица с Trp64Trp генотипом (n=116); учитывая малую (n=5; 2,3%) численность пациентов с Arg64Arg генотипом, последние были объединены с носителями Trp64Arg генотипа во вторую группу (n=97). Обследованные пациенты обеих групп были сопоставимы по возрасту, наличию курения, но отличались по гендерному показателю: во второй группе было больше мужчин (табл.2).

Сравнительный анализ в группах показал, что пациенты с Trp64Arg и Arg64Arg генотипа-

ми по сравнению с Trp64Trp генотипом имели большие значения ИМТ, ОТ и соотношения ОТ/ОБ, соответственно у них чаще отмечались ожирение ($p<0,00009$) и АО ($p<0,01$) (табл. 2).

По уровню САД и ДАД обе группы были сопоставимы (табл. 2).

Из 213 обследованных пациентов диагностировано 36 (16,9%) больных СД 2 типа. При этом больных СД 2 типа было меньше в Trp64 гомозиготной группе (10,3%), чем в группе пациентов с Trp64Arg и Arg64Arg генотипами (24,7%) ($p<0,005$). Уровень гликемии оказался несколько выше во второй группе пациентов, но указанные различия не были статистически достоверными. Аналогичные изменения выявлены и в отношении инсулинемии (табл. 2).

Концентрация ОХ в сравниваемых группах достоверно не различалась; не было выявлено статистически значимых изменений и в отношении ТГ, ЛНП-ХС. В то же время уровень

ЛВП-ХС был ниже у пациентов с Trp64Arg и Arg64Arg генотипами, чем у Trp64 гомозигот ($p<0,03$) (табл. 2).

Частота генотипов Trp64Arg полиморфизма гена β 3АР оценивалась отдельно у пациентов с ожирением и АО. В связи с этим по ИМТ пациенты были распределены на 2 подгруппы: с ИМТ>30 ($n=87$) и ИМТ<30 ($n=126$) (табл. 3). Анализ полученных результатов показал, что среди пациентов с ИМТ>30 преобладали носители Trp64Arg мутации (62,1%) (табл. 3).

По наличию АО пациенты также были распределены на подгруппы: с АО ($n=131$) и без АО ($n=82$). Среди пациентов с АО носители Trp64Arg генотипа встречались несколько чаще, чем Trp64Trp (табл. 3).

Проведенный корреляционный анализ Trp64Arg и Arg64Arg генотипов с кардиометаболическими факторами риска показал достоверную корреляцию с ИМТ и ОТ. Слабая отрица-

Таблица 2

Общая характеристика обследованных пациентов по группам

| Показатель | 1 | 2 | p |
|------------------------|------------------|--------------------------|---------|
| | Trp64Trp (n=116) | Trp64Arg+Arg64Arg (n=97) | |
| Пол (мужской), % | 59 | 78 | 0,004 |
| Возраст, годы | 51,0 ± 7,9 | 50,4 ± 7,3 | нд |
| Ожирение, % | 29 | 55,2 | 0,00009 |
| ИМТ, кг/м ² | 27,7 ± 4,5 | 29,4 ± 4,9 | 0,008 |
| АО, % | 54,3 | 70,1 | 0,01 |
| ОТ, см | 94,9 ± 13,2 | 101,7 ± 14 | 0,0004 |
| ОТ/ОБ | 0,95 ± 0,1 | 1,0 ± 0,1 | 0,03 |
| САД, мм.рт.ст. | 134 ± 23 | 136 ± 24 | нд |
| ДАД, мм.рт.ст. | 85 ± 14 | 87 ± 13 | нд |
| СД 2 типа, % | 10,3 | 24,7 | 0,005 |
| Сахар, ммоль/л | 5,9 ± 1,9 | 6,1 ± 2,0 | нд |
| Курение, % | 24,7 | 25 | нд |
| ОХ, ммоль/л | 5,1 ± 1,1 | 4,9 ± 0,9 | нд |
| ЛНП-ХС, ммоль/л | 3,2 ± 0,9 | 3,1 ± 0,8 | нд |
| ЛВП-ХС, ммоль/л | 1,12 ± 0,3 | 1,02 ± 0,3 | 0,03 |
| ТГ, ммоль/л | 1,7 ± 1,1 | 1,9 ± 1,5 | нд |
| Инсулин, μ IU/ml | 7,8 ± 5,0 | 9,0 ± 5,9 | нд |
| ИР, % | 21,3 | 28,3 | нд |
| МС, % | 37,9 | 49,5 | нд |

Примечания: нд – не достоверно; ИР – инсулинорезистентность.

Распределение генотипов Trp64Arg полиморфизма гена ВЗАР среди пациентов с общим и абдоминальным ожирением

| | ИМТ * | | АО# (ОТ ≥ 102см у мужчин; ≥ 88см – у женщин) | |
|----------------------------|------------|-------------|---|------------|
| | >30 (n=87) | <30 (n=126) | есть (n=131) | нет (n=82) |
| Trp64Trp, n (%) | 33 (37,9) | 83 (65,9) | 63 (49,1) | 53 (64,6) |
| Trp64Arg + Arg64Arg, n (%) | 54 (62,1) | 43 (34,1) | 68 (51,1) | 29 (35,4) |
| Всего | 87 | 126 | 131 | 82 |

Примечание: * – $\chi^2 = 16,2$; $p < 0,00057$; # – $\chi^2 = 5,56$; $p = 0,018$

тельная корреляционная связь Trp64Arg генотипа βЗАР была выявлена с ЛВП-ХС (табл. 4).

Таблица 4

Корреляционный анализ Trp64Arg и Arg64Arg генотипов с кардиометаболическими факторами риска

| | n=213 | |
|-------------|-------|--------|
| | R | p |
| Возраст | -0,03 | 0,7 |
| ИМТ | 0,2 | 0,003 |
| ОТ | 0,2 | 0,0005 |
| Инсулин | 0,1 | 0,2 |
| Индекс НОМА | 0,1 | 0,2 |
| ОХ | -0,06 | 0,4 |
| ТГ | 0,05 | 0,4 |
| ЛНП-ХС | -0,05 | 0,5 |
| ЛВП-ХС | -0,14 | 0,049 |
| САД | 0,06 | 0,4 |
| ДАД | 0,1 | 0,1 |
| Сахар крови | 0,006 | 0,9 |

Примечания: R – коэффициент Спирмена.

Обсуждение. Результаты работы показали, что в обследованной группе этнических кыргызов преобладали Trp64Trp генотип (n=116; 54,5%) и Trp64 аллель (0,761). Гомозиготный Arg64 генотип встречался крайне редко – у 5 (2,3%) пациентов, поэтому генотипы с наличием Arg64 аллели (Trp64Arg и Arg64Arg) были объединены в одну группу (n=97).

В клинических исследованиях была выявлена связь Arg64Arg генотипа Trp64Arg полимор-

физма гена βЗАР с инсулинорезистентностью, ожирением и дислипидемией в финской, японской популяциях [7–9], что свидетельствует о возможном участии данной мутации в патогенезе метаболических нарушений, вероятно, вследствие влияния на липолиз, теплообразование и чувствительность к инсулину. В настоящем исследовании обнаружена более частая встречаемость больных СД 2 типа в группе пациентов-носителей Trp64Arg и Arg64Arg генотипов. В указанной группе уровень инсулинемии оказался несколько выше, хотя различия не были статистически достоверными. Полагают, что гиперинсулинемия является результатом инсулинорезистентности. Так, в исследовании Urhammer S.A. с соавт. были выявлены повышенный уровень в крови С-пептида и низкая чувствительность к инсулину у пациентов с Arg64Arg генотипом [9], что указывает на возможный вклад Arg64 аллели в ухудшение чувствительности к инсулину и, следовательно, влияние на метаболический контроль при СД 2 типа.

Как известно, одним из основных факторов риска развития СД 2 типа является ожирение. При этом одинаково важны не только степень и длительность ожирения, но и распределение жировой ткани по телу [11]. Показано, что уровень мРНК βЗАР был значительным в глубоких жировых отложениях (сальник, околопочечная жировая клетчатка) и существенно меньше – в подкожной жировой ткани [12]. Среди обследованных нами пациентов с Trp64Arg и Arg64Arg генотипами значения ОТ оказались достоверно большими по сравнению с носителями Trp64Trp генотипа ($p < 0,0004$).

Изменение активности ВЗАР способствует повышению накопления жиров в белой жировой ткани и снижению теплообразования в бурой жировой ткани [13]. Замедленное окисле-

ние жиров, вероятно, служит предпосылкой к последующему прогрессирующему нарастанию жировой массы в организме [14]. В клиническом исследовании у жителей Италии была выявлена достоверная ассоциация Trp64Arg полиморфизма гена β 3АР с ожирением [15], хотя в других работах подобная ассоциация не подтвердилась [16]. Более убедительная связь Trp64Arg полиморфизма гена β 3АР с ИМТ была показана в азиатской популяции, в которой к тому же распространенность данного полиморфизма оказалась выше, чем у представителей белой расы [17]. В настоящем исследовании в обследованной группе этнических кыргызов Trp64Arg полиморфизм гена β 3АР ассоциировался с повышенным ИМТ и ожирением.

Некоторые исследования указывают на взаимосвязь Trp64Arg полиморфизма гена β 3АР с артериальной гипертензией, например, у финнов [7], жителей острова Сардиния [18]. По данным нашего исследования, средние уровни САД и ДАД у пациентов с различными генотипами не отличались. Подобные противоречивые результаты, вероятно, обусловлены этническими особенностями питания и уровнем физической активности кыргызов.

Результаты исследований ассоциации Trp64Arg полиморфизма гена β 3АР с дислипидемией неоднородны и противоречивы. Так, при исследовании молодых датчан выявлена взаимосвязь данной мутации с гипертриглицеридемией и повышением ЛНП-ХС сыворотки крови [9]. В испанском исследовании Trp64Arg полиморфизм гена β 3АР был достоверно связан с ТГ и ОХ сыворотки крови [19]. В то же время в исследованиях Hao et al. [20], Oksanen et al. [21] не обнаружено ассоциации генотипа β 3АР с уровнями ТГ, ХС и сахара сыворотки крови. В изученной нами группе этнических кыргызов у пациентов-носителей Trp64Arg полиморфизма гена β 3АР выявлены более низкие значения ЛВП-ХС сыворотки крови. Однако учитывая большую численность мужчин в группе пациентов с Trp64Arg и Arg64Arg генотипами, нами был проведен корреляционный анализ с кардиометаболическими факторами риска, согласно которому была выявлена отрицательная корреляционная связь Trp64Arg генотипа с уровнем ЛВП-ХС ($r = -0,14$; $p < 0,049$). Со стороны других компонентов липидного спектра достоверных изменений не обнаружено.

В нашем исследовании не выявлены изменения частоты встречаемости инсулинорезистентности и МС в сравниваемых группах.

Таким образом, мутация гена β 3АР, вероятно, может играть различную генетическую роль в формировании компонентов МС, в зависимости от этнической принадлежности, а также особенностей питания и образа жизни пациентов. В настоящей работе впервые исследован Trp64Arg полиморфизм гена β 3АР у этнических кыргызов. Выявлена ассоциация данного полиморфизма гена β 3АР с несколькими компонентами МС: ожирением, АО и сниженным уровнем ЛВП-ХС.

Литература

1. Grundy S.M. Metabolic Syndrome Pandemic // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008. V.28. P. 629–636.
2. Grundy S.M., Cleeman J.I., Daniels S.R. et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung and Blood Institute scientific statement // *Curr Opin Cardiol.* 2006. V. 21. P. 1–6.
3. Walston J., Silver K., Bogardus C., et al. Time of onset of non-insulin dependent diabetes mellitus and genetic variation in the b3-adrenergic receptor gene // *N Engl J Med.* 1995. V. 333. P. 343–347.
4. Langin D., Tavernier G., Lafontan M. Regulation of b3-adrenoreceptor expression in white fat cells // *Fundam Clin Pharmacol.* 1995. V.9. P. 97–106.
5. Arbeeny C.M., Meyers D.S., Hillyer D.E., Bergquist K.E. Metabolic alterations associated with the antidiabetic effect of b3-adrenergic receptor agonists in obese mice // *Am J Physiol.* – 1995. V. 268. P. 678–684.
6. Clement K., Vaisse C., Manning B.S., et al. Genetic variation in the b3-adrenergic receptor and an increased capacity to gain weight in patients with morbid obesity // *N Engl J Med.* 1995. V. 333. P. 352–354.
7. Widen E., Lehto M., Kanninen T., et al. Association of a polymorphism in the b3-adrenergic receptor gene with features of the insulin resistance syndrome in Finns // *N Engl J Med.* 1995. V. 333. P. 348–351.
8. Kadowaki H., Yasuda K., Iwamoto K., et al. A mutation in the b3- adrenergic receptor gene is associated with obesity and hyperinsulinemia in Japanese subjects // *Biochem Biophys Res Commun.* 1995. V. 215. P. 555–560.
9. Urhammer S.A., Clausen J.O., Hansen T., Pedersen O. Insulin sensitivity and body weight changes in young white carriers of the codon 64 amino acid polymorphism of the b3-adrenergic receptor gene // *Diabetes.* 1996. V. 45. P. 1115–1120.

10. Friedewald W.T., Levy R.I., Fredrickson D.S. Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge // *Clin Chem*. 1972. V. 18. P. 499–502.
11. Walston J., Silver K., Shuldiner A.R. The b₃-adrenergic receptor and susceptibility to obesity, the insulin resistance syndrome, and non insulin-dependent diabetes mellitus In Spiegel AM. ed. *Contemporary Endocrinology: G Proteins, Receptors, and Disease*. Totowa, NJ: Humana Press Inc. 1997. P. 301–318.
12. Krief S., Strosberg A.D., Nyberg S., et al. Tissue distribution of β₃-adrenergic receptor mRNA in man // *J Clin Invest*. 1993. V. 91. P. 344–349.
13. Proenza A.M., Poissonnet C.M., Ozata M. et al. Association of sets of alleles of genes encoding b₃-adrenoreceptor, uncoupling protein 1 and lipoprotein lipase with increased risk of metabolic complications in obesity // *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2000. V. 24. P. 93–100.
14. Astrup A., Raben A., Buemann B., Toubro S. Fat metabolism in the prediction to obesity // *Ann NY Acad Sci*. 1997. V. 827. P.417–428.
15. Strazzullo P., Iacone R., Siani A., et al. Relationship of Trp64Arg polymorphism of the beta₃ adrenoceptor gene to central adiposity and high blood pressure: interaction with age. Cross-sectional and longitudinal findings of the Olivetti prospective heart study // *J Hypertens*. 2001. V. 19. P. 399–406.
16. Büettner R., Schäffler A., Arndt H. et al. The Trp64Arg polymorphism of the b₃-adrenergic receptor gene is not associated with obesity or type 2 diabetes mellitus in a large population-based Caucasian cohort // *J Clin Endocrinol Metab*. 1998. V.83. P. 2892–2897.
17. Kurokawa N., Nakai K., Kameo S., et al. Association of BMI with the b₃-adrenergic receptor gene polymorphism in Japanese:meta-analysis // *ObesRes*. 2001. V.9. P. 741–745.
18. Tonolo G., Melis M.G., Secchi G., et al. Association of Trp64Arg b₃-Adrenergic-receptor gene polymorphism with essential hypertension in the Sardinian population // *J Hypertens*. 1999. V. 17. P. 33–38.
19. Corella D., Guillem M., Portolers O., et al. Gender specific associations of the Trp64Arg mutation in the b₃-adrenergic receptor gene with obesity-related phenotypes in a Mediterranean population: interaction with a common lipoprotein lipase gene variation // *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2001. V. 25. P. 348–360.
20. Hao K., Peng S., Xing H., et al. b₃-Adrenergic receptor polymorphism and obesity-related phenotypes in hypertensive patients // *Obesity Res*. 2004. V. 12. P. 1433–1334.
21. Oksanen L., Mustajoki P., Kaprio J., et al. Polymorphism of the beta 3-adrenergic receptor gene in morbid obesity // *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1996. V.20. P.1055–1061.