

УДК 575.174.015.3:616.36-003.826

ВЫЯВЛЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ПРИ НЕАЛКОГОЛЬНОЙ ЖИРОВОЙ БОЛЕЗНИ ПЕЧЕНИ У ЖИТЕЛЕЙ ГОМЕЛЬСКОЙ ОБЛАСТИ

Суханова Л. Л., Калинин А. Л., Яцук М. Н.

*Учреждение образования «Гомельский государственный медицинский университет»,
г. Гомель, Республика Беларусь*

Реферат. Неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП) в настоящее время является наиболее распространенным заболеванием печени во всем мире. В развитии НАЖБП ключевую роль играют генетические факторы. Исследование полиморфизма rs738409 гена PNPLA3 и rs58542926 гена TM6SF2 было проведено в научно-исследовательской лаборатории УО «Гомельский государственный медицинский университет». Для генотипирования вариантов PNPLA3 и TM6SF2 использовали метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). Всего было исследовано 85 образцов ДНК, из них 48 индивидов, имеющих НАЖБП, и 37 здоровых добровольцев. Анализ частоты аллелей полиморфизмов rs738409 гена PNPLA3 и rs58542926 гена TM6SF2 установил, что группа пациентов, так же как и группа здоровых лиц, характеризовалась преобладанием носителей аллеля С.

Ключевые слова: полиморфизм, TM6SF2, PNPLA3, НАЖБП.

Введение. НАЖБП представляет собой заболевание, обусловленное прогрессирующим накоплением жира в гепатоцитах, превышающее 5 % их массы, в отсутствие таких причин, как употребление алкоголя (более 20 г в день для женщин и более 30 г в день для мужчин), вирусная инфекция или другие заболевания печени. Данное заболевание включает целый спектр патологических состояний в диапазоне от относительно благоприятного стеатоза печени до более тяжелого неалкогольного стеатогепатита (НАСГ) с различной степенью фиброза и далее до цирроза печени (ЦП), который служит главным фактором риска развития гепатоцеллюлярного рака (ГЦР).

В настоящее время НАЖБП представляет собой наиболее распространенное заболевание печени в мире: им страдают до 25 % населения Земли с максимальной распространенностью среди жителей Европы и Америки (24 % и 30 % соответственно). При этом распространенность среди населения Азии варьирует в пределах 15–40 % [1–3].

По данным многоцентрового исследования DIREG2, проведенного в России, у пациентов амбулаторного профиля распространенность НАЖБП составила 37,3 %. В 2019 г. получены и опубликованы данные о частоте НАЖБП в амбулаторно-поликлиническом звене одного медицинского центра, что составило 24,9 %. При этом по данным другого популяционного исследования для жителей

г. Москвы в целом этот показатель составил 7,4 % [4].

Частота встречаемости НАЖБП возрастает среди лиц с ожирением и метаболическим синдромом (МС). Так, распространенность достигает 80 % на фоне ожирения против 16 % у лиц с нормальным весом без метаболических факторов риска. Развитие НАЖБП коррелирует с индексом массы тела (ИМТ), но в большей степени зависит от накопления висцерального жира. Исследования свидетельствуют также о тесной связи НАЖБП с инсулинорезистентностью (ИР) / сахарным диабетом 2-го типа (СД2). От 25 % до 75 % пациентов с диабетом имеют стеатоз печени, в то же время 75 % пожилых людей с диабетом и ожирением страдают уже НАСГ и прогрессирующим фиброзом [1–3].

НАЖБП повышает смертность населения как за счет печеночных причин (ЦП, ГЦР), так и внепеченочных проявлений и осложнений (таких как МС, сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ), СД 2 и др.). Исходя из этого следует, что правильное ведение пациентов с НАЖБП может положительно повлиять на течение коморбидных состояний и наоборот. Это особенно важно, поскольку первичная причина смертности у пациентов с НАЖБП, в частности в отсутствие выраженного фиброза или цирроза, связана с ССЗ, а не с болезнью печени. Следовательно, НАЖБП — мультисистемное заболевание, которое требует соответствующего

ющего клинического подхода: скрининг, ранняя диагностика, лечение и профилактика повреждений печени и основных ассоциированных состояний [4].

В последние годы стали активно проводиться исследования, свидетельствующие о роли наследственных механизмов развития НАЖБП. Так, в частности, в ходе полномасштабных генетических исследований (GWAS, genome-wide association studies), проведенных на многонациональных когортах пациентов, установлена тесная связь между развитием НАЖБП и однонуклеотидными полиморфизмами (SNP, single nucleotide polymorphism) в некоторых генах. Одни из наиболее значимых ассоциаций были выявлены между наличием НАЖБП и/или НАСГ и наличием SNP в следующих генах: PNPLA3 (пататиноподобный домен, содержащий фосфолипазу-3; ген адипонутрина); TM6SF2 (трансмембранный белок 6 суперсемейства-2). Наиболее убедительные данные в различных популяциях получены об ассоциации полиморфизма rs738409 в гене PNPLA3 и rs58542926 гена TM6SF2 с прогрессирующим течением НАСГ (развитием стеатоза, фиброза и ГЦР) [5].

По данным молекулярно-генетических исследований ген PNPLA3, расположенный на длинном плече хромосомы 22q13.31, экспрессируется в мембранах гепатоцитов и отвечает за внутрипеченочный обмен липидов путем кодирования синтеза адипонутрина — белка-регулятора активности триглицеридлипазы в адипоцитах [2]. Исследование GWAS выявило также, что SNP в гене PNPLA3 ассоциированы с активностью печеночных ферментов — аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспаратаминотрансферазы (АСТ) в плазме. Вариант I148M (rs738409) в гене PNPLA3 приводит в замене цитозина на гуанин в ДНК, что в свою очередь вызывает замену аминокислоты изолейцин на метионин в позиции 148 адипонутрина и определяет дальнейшие изменения механизмов липидного обмена в печени [2]. Вариант I148M PNPLA3 (rs738409 C/G) устойчив к деградации, накапливается на липидных каплях и достаточен для индуцирования стеатоза. Аллель G rs738409 ассоциирована с усиленной аккумуляцией жира в печени и воспалением. Гомозиготный ген в варианте rs738409 GG свойствен пациентам с НАСГ. Генотип GG отмечается чаще и коррелирует с ИМТ и степенью фиброза у лиц с ГЦР, возникшим на фоне НАЖБП [4].

По данным Национального центра биотехнологической информации США (NCBI,

National Center for Biotechnological Information) частота аллеля G полиморфного варианта I148M гена PNPLA3 (rs738409) в различных популяциях колеблется от 19,6 % (африканская популяция AFD_AFR_PANEL ss24098326) до 43,2 % (азиатская популяция HarMap-JPT ss76896972).

TM6SF2 — ген с неизвестной биологической функцией локализуется на 19 хромосоме и кодирует белок, состоящий из 351 аминокислоты, имеющий 7–10 трансмембранных доменов. Ген TM6SF2 экспрессируется в клетках печени, тонкой кишки и почек. Продукт гена преимущественно локализуется в эндоплазматическом ретикулуме и промежуточном компартменте ретикулума и комплекса Гольджи. Мутация E167K гена TM6SF2, приводящая к замене глутамина на лизин в положении 167, вызывает снижение экспрессии на 46 %. Функциональные исследования продемонстрировали, что активность TM6SF2 играет ключевую роль в секреции липопротеидов очень низкой плотности (ЛПОНП) и активности щелочной фосфатазы (ЩФ) в сыворотке крови [6].

Кроме того, было показано, что ингибирование TM6SF2 сопровождается значимым снижением экспрессии ряда других генов, играющих важную роль в синтезе триглицеридов (ТГ), и повышенным накоплением жировых включений в гепатоцитах. В целом мутация E167K гена TM6SF2 связана со снижением функции кодируемого им белка, что в свою очередь сопровождается повышением содержания ТГ в печени (за счет снижения секреции ЛПОНП), ростом активности ЩФ, снижением экспрессии генов, регулирующих метаболизм липидов, и каталитической активности стероловых изомераз [6].

Так, пациенты с аллелем T гена TM6SF2 rs58542926, предрасполагающим к развитию НАЖБП/НАСГ, имели более высокий уровень липополисахарид-связывающего белка (LBP, lipopolysaccharide binding protein — маркер эндотоксемии). У пациентов с НАЖБП уровни LBP и эндотоксина коррелировали со степенью долькового воспаления и фиброза, также с фрагментами цитокератина-18 и уровнем жесткости печени. По литературным данным выявленные мутации играют значимую этиологическую роль в развитии и прогрессировании НАЖБП в отдельных регионах России [5]. При этом распространенность полиморфизма rs738409 в гене PNPLA3 и rs58542926 в гене TM6SF2, ассоциированных с прогрессирующим течением НАСГ, до настоящего времени

среди населения Республики Беларусь не изучалась.

Цель работы — изучение распределения частот аллелей и поиск ассоциаций полиморфных вариантов гена PNPLA3 (rs738409) и гена TM6SF2 (rs58542926) среди населения Гомельской области.

Материалы и методы. Экспериментальная часть работ по генотипированию полиморфизмов rs738409 гена PNPLA3 и rs58542926 гена TM6SF2 была проведена в научно-исследовательской лаборатории УО «Гомельский государственный медицинский университет» (ГомГМУ). Для исследования использованы образцы ДНК пациентов с различными формами НАЖБП, обратившихся в профессорско-преподавательский консультативный центр, а также здоровых добровольцев. Выборка исследования включает 48 пациентов. В состав выборки вошли мужчины ($n = 25$) и женщины ($n = 23$) в возрасте от 22 до 70 лет, средний возраст $47,2 \pm 1,23$ года. Группой сравнения служила выборка из 37 здоровых добровольцев — мужчин ($n = 30$) и женщин ($n = 7$) в возрасте от 21 до 63 лет, средний возраст $38,1 \pm 0,78$ года. Все участники исследования постоянно проживают на территории Гомельской области. Информированное согласие на проведение генетического исследования было получено от каждого участника исследования. Научное исследование получило одобрение этического комитета УО «ГомГМУ».

Критериями включения в исследование были: отсутствие поражения печени хроническими вирусными гепатитами, аутоиммунного гепатита, первичного билиарного холангита, первичного склерозирующего холангита, наследственного гемохроматоза, болезни Вильсона — Коновалова, а также отсутствие злоупотребления алкоголем (>30 г/л).

Всем участникам исследования проведено комплексное клинико-функциональное обследование для подтверждения диагноза и были исключены конкурирующие этиологические факторы и другие заболевания печени. Паци-

енты отрицали употребление алкоголя, алкогольные стигмы и лабораторные маркеры злоупотребления алкоголем (соотношение АСТ/АЛТ более 2, повышение активности гаммаглутамилтранспептидазы (ГГТП), макроцитоз эритроцитов) отсутствовали, опросники CAGE и AUDIT дали отрицательные результаты. Гепатотоксичных препаратов, в том числе средств народной и нетрадиционной медицины, биодобавок, в последние 6 месяцев все пациенты не использовали. Анализы на маркеры вирусных гепатитов В и С — отрицательные. Результаты иммунологического исследования позволили исключить аутоиммунные заболевания печени у данных пациентов. Полученные результаты при исследовании показателей обмена железа (ферритин, трансферрин, сывороточное железо) и меди (церулоплазмин) позволили исключить поражение печени как результата нарушений их метаболизма в организме пациентов. Также был исключен гипотиреоз: уровень тиреотропного гормона в сыворотке крови был в пределах референсных значений.

Взятие крови производили в вакуумную систему типа Vacuette с ЭДТА в соответствии со стандартной методикой. Лейкоциты для экстракции ДНК получали традиционным способом. Экстрагировали ДНК набором «АртРНК» (производитель «АртБиоТех», Беларусь) согласно инструкции. Синтез праймеров производился ОДО «Праймтех» (Беларусь по заказу).

ПЦР проводили с 1 мкл ДНК в режиме амплификации с последующей электрофоретической детекцией ампликонов в 1,7 % агарозном геле.

На этапе рестрикции ампликоны, полученные с помощью праймеров PNPLA3, обрабатывались рестриктазой BstF5I (BseGI). Ампликоны, полученные с помощью праймеров TM6SF2, обрабатывались рестриктазой Hpy 188I. Объем ампликона в одном образце 6 мкл, рестриктазы 0,5 мкл. Условия инкубации, активность рестриктаз, производитель указаны в таблице 1.

Таблица 1 — Описание рестриктаз BstF5I (BseGI), Hpy 188I

Рестриктаза	Активность, ед/мл	Температура инкубации, °С	Время инкубации, ч	Производитель
BstF5I (BseGI)	10	55	16	Thermo Fisher Scientific, Lithuania
Hpy 188I	10000	37	24	New England Biolabs, England

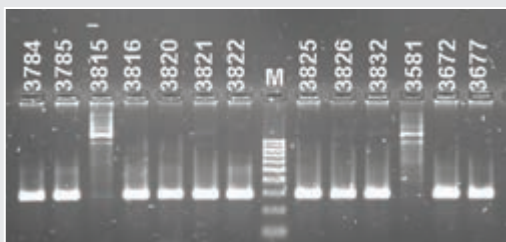


Рисунок 1 — Электрофоретическая детекция фрагментов гена PNPLA3

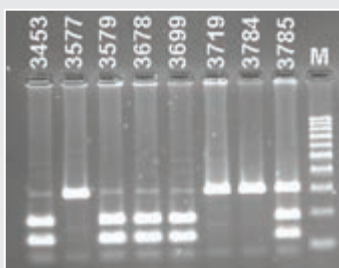


Рисунок 2 — Электрофоретическая детекция фрагментов гена PNPLA3 после обработки рестриктазой BstF5I (BseGI)

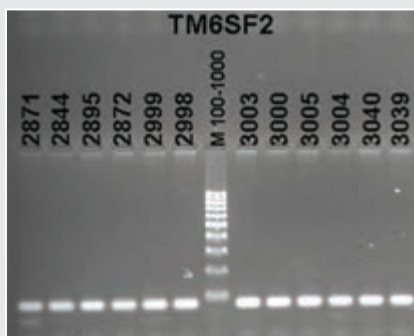


Рисунок 3 — Электрофоретическая детекция фрагментов гена TM6SF2

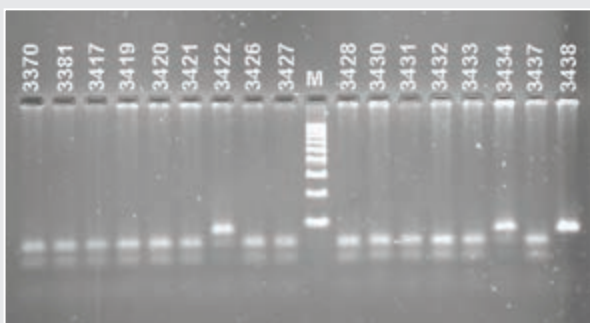


Рисунок 4 — Электрофоретическая детекция фрагментов гена TM6SF2 после обработки рестриктазой Hru 188I

Детекцию рестриктов проводили при помощи электрофоретической разгонки в 2,5 % агарозном геле.

Ожидаемая зона после амплификации гена PNPLA3 — 333 п.н., как представлено на рисунке 1.

После обработки рестриктазой BstF5I (BseGI) могут визуализироваться три зоны размером 333, 200, 133 п.н. Образцы размером 333 п.н. соответствуют GG-генотипу, размером 200, 133 п.н. — CC-генотипу, размером 333, 200, 133 п.н. — GC-генотипу. Пример электрофореграммы рестриктов представлен на рисунке 2.

Ожидаемая зона после амплификации гена TM6SF2 — 80 п.н., как представлено на рисунке 3.

После обработки рестриктазой Hru 188I визуализируются три зоны размером 80, 52, 28 п.н. Образцы размером 80 п.н. соответствуют TT-генотипу, размером 52, 28 п.н. — CC-генотипу, размером 80, 52, 28 п.н. — TC-генотипу. Пример электрофоретической детекции рестриктов представлен на рисунке 4.

При статистическом описании результатов, встречаемость генотипов исследуемых полиморфизмов выражали в относительных частотах (%). Частотный анализ проводили с использованием критерия χ^2 Пирсона. Для слабонасыщенных показателей (со значениями ≤ 5), оценку значимости проводили с помощью рандомизированной процедуры Монте-Карло. Различия считали значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Анализ распределения частот генотипов и аллелей полиморфного варианта гена PNPLA3 (rs738409) в исследуемой группе не выявил статистически значимых различий, при этом в группе здоровых добровольцев преобладал гомозиготный генотип CC (56,8 % участников), а частота встречаемости аллеля C составила 0,676. Однако статистически значимой разницы между двумя группами не установлено. При этом критерий хи-квадрат Пирсона для частоты встречаемости аллеля G гена PNPLA3 составил 3,28; $p = 0,07$, что может свидетельствовать о тенденции к статистически значимым различиям в частоте встречаемости данного аллеля. Частоты генотипов и аллелей полиморфизма rs738409 гена PNPLA3, а также расчет статистической значимости различий приведены в таблицах 2 и 3 соответственно.

Таблица 2 — Распределение частот генотипов и аллелей полиморфизма rs738409 гена PNPLA3

Показатель	Генотип, %				Аллель	
	GG	CC	GC	Всего	G	C
Группа исследования						
Количество пациентов, <i>n</i>	19	17	12	48	—	—
Ожидаемое количество, <i>n</i>	15,2	21,5	11,3	48,0	—	—
Стандартизованный остаток	1,0	-1,0	0,2	—	—	—
Процент в исследуемой группе	39,6	35,4	25,0	100	0,521	0,479
Контрольная группа						
Количество, <i>n</i>	8	21	8	37	—	—
Ожидаемое количество, <i>n</i>	11,8	16,5	8,7	37,0	—	—
Стандартизованный остаток	-1,1	1,1	-0,2	—	—	—
Процент в контрольной группе	21,6	56,8	21,6	100	0,324	0,676

Таблица 3 — Статистический анализ различий между группами для генотипов полиморфизма rs738409 гена PNPLA3

Показатель	Значение	Степень свободы	Асимптотическая значимость (двусторонняя)	Значимость Монте – Карло (двусторонняя)		
				Значимости	95%-й ДИ	
					Нижняя граница	Верхняя граница
Хи-квадрат Пирсона	4,352	2	0,114	0,117	0,109	0,126
Отношения правдоподобия	4,414	2	0,110	0,117	0,109	0,126
Точный критерий Фишера	4,289	—	—	0,117	0,109	0,126
Количество допустимых наблюдений	85	—	—	—	—	—

Анализ распределения частот генотипов и аллелей полиморфного варианта гена TM6SF2 (rs58542926) в исследуемой группе продемонстрировал подавляющее преобладание генотипа CC (81,3 % участников) и аллеля C (0,907). В группе здоровых добровольцев также преобладал гомозиготный генотип CC (75,7 % участников),

а частота встречаемости аллеля C составила 0,856. При этом статистически значимой разницы между двумя группами также не установлено. Частоты генотипов и аллелей полиморфизма rs58542926 гена TM6SF2, а также расчет статистической значимости различий, приведены в таблице 4 и таблице 5 соответственно.

Таблица 4 — Распределение частот генотипов и аллелей полиморфизма rs58542926 гена TM6SF2

Показатель	Генотип, %				Аллель	
	CC	TC	TT	Всего	C	T
Группа исследования						
Количество, <i>n</i>	39	9	0	48	—	—
Ожидаемое количество, <i>n</i>	37,8	9,0	1,1	48,0	—	—
Стандартизованный остаток	0,2	0,0	-1,1	—	—	—
Процент в исследуемой группе	81,3	18,8	0,0	100,0	0,907	0,093
Контрольная группа						
Количество, <i>n</i>	28	7	2	37	—	—
Ожидаемое количество, <i>n</i>	29,2	7,0	0,9	37,0	—	—
Стандартизованный остаток	-0,2	0,0	1,2	—	—	—
Процент в контрольной группе	75,7	18,9	5,4	100,0	0,856	0,144

Таблица 5 — Статистический анализ различий между группами для генотипов полиморфизма rs58542926 гена TM6SF2

Показатель	Значение	Степень свободы	Асимптотическая значимость (двусторонняя)	Значимость Монте – Карло (двусторонняя)		
				Значимости	95%-й ДИ	
					Нижняя граница	Верхняя граница
Хи-квадрат Пирсона	2,677	2	0,262	0,393	0,381	0,406
Отношения правдоподобия	3,410	2	0,182	0,336	0,324	0,348
Точный критерий Фишера	2,306	—	—	0,393	0,381	0,406
Количество допустимых наблюдений	85	—	—	—	—	—

Заключение. Таким образом, в результате проведенного исследования установлено, что среди жителей Гомельской области при сравнительном анализе распределения аллелей полиморфизма rs738409 гена PNPLA3 и полиморфизма rs58542926 гена TM6SF2 преобладает носительство аллеля С, как в группе здоровых лиц, так и среди пациентов с НАЖБП. Вероятно, это обусловлено небольшой выборкой пациентов, что требует дальнейшего изучения. При этом в исследуемой группе отмечается тенденция к повышению, по сравнению с контрольной группой, частоты выявления аллеля GG (39,6 и 21,6 % соответственно)

гена PNPLA3, носительство которого характерно для пациентов с НАСГ. Предполагаем, что полиморфизм гена PNPLA3 I148M (rs738409) имеет значение для формирования неблагоприятного течения НАЖБП в популяции пациентов Гомельской области. Дальнейшее изучение на более крупных выборках пациентов с различными формами НАЖБП позволит уточнить эти данные и, возможно, разработать методы скрининга, позволяющие своевременно выявлять лиц с высоким риском неблагоприятного течения данного заболевания. Все это поможет в будущем внести вклад в развитие персонализированной медицины.

Список цитированных источников

1. From NAFLD to MAFLD: a «redefining» moment for fatty liver disease / K. I. Zheng [et al.] // Chin. Med. J. (Engl.). — 2020. — № 133. — P. 2271–2273.
2. Fasting, Nutrition and Weight Loss: An Approach to Refine Non-Alcoholic Fatty Liver Disease / G. A. Al-Samhari [et al.] // J. Nutr. Sci. Vitaminol. — 2021. — № 67. — P. 366–374.
3. Global perspectives on nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis / Z. Younossi [et al.] // Hepatology. — 2019. — № 69. — P. 2672–2682.
4. Национальный Консенсус для врачей по ведению взрослых пациентов с неалкогольной жировой болезнью печени и ее основными коморбидными состояниями / М. В. Маевская [и др.] // Терапевтический архив. — 2022. — № 94(2). — С. 216–253.
5. Неалкогольная жировая болезнь печени у взрослых: клиника, диагностика, лечение. Рекомендации для терапевтов (3-я версия) / Л. Б. Лазебник [и др.] // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. — 2021. — № 185(1). — С. 4–52.
6. Effects of TM6SF2 E167K on hepatic lipid and very low-density lipoprotein metabolism in humans / J. Borjān [et al.] // J. Cl. Insight. — 2020. — № 5(24). — P. 144079.

Identification of gene polymorphisms in non-alcoholic fatty liver disease in residents of the Gomel region

Sukhanova L. L., Kalinin A. L., Yatsuk M. N.

Gomel State Medical University, Gomel, Republic of Belarus

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the most common liver disorder worldwide. Genetic factors play a key role in the development of NAFLD. The study of polymorphism rs738409 of the PNPLA3 and rs58542926 of the TM6SF2 gene was carried out in the research laboratory of the Gomel

State Medical University. PCR-based assays were used to genotype the PNPLA3 and TM6SF2 variants. A total of 85 DNA samples were studied, of which 48 individuals with a history of NAFLD and 37 healthy volunteers. An analysis of the frequency of alleles rs738409 polymorphism of the PNPLA3 gene and rs58542926 polymorphism of the TM6SF2 gene found that the group of patients also prevails in relation to carriers of the C allele.

Keywords: polymorphism, TM6SF2, PNPLA3, NAFLD.

Поступила 22.06.2022