

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. – С. 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., dyakonovaa@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.

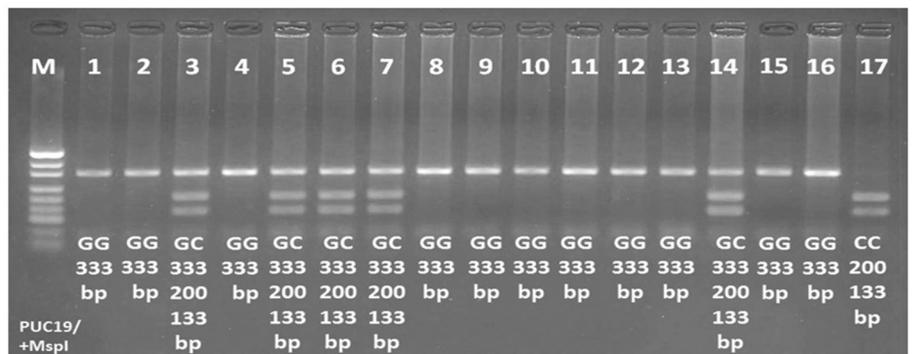
гена *PNPLA3*, кодирующего синтез белка-фермента адипонутрина.

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/+MspI 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. Однуклеотидный полиморфизм (SNP) I148M (rs738409) определяли с помощью ПЦР-ПДРФ метода.

Амплификация области гена, содержащего полиморфный вариант, проводилась стандартными параметрами праймеров (форвард праймер: 5'-TGGGCCTGAAGTCCGAGGGT-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 ddH<sub>2</sub>O, 2,5 мкл 10xПЦР буфер, 2,5 мкл 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5 мкл 2,5 mM dNTP Mix, 1,5 мкл (10 pkmol/ мкл) каждого олигонуклеотидного праймера, 0,3 ед. (1,5 ед.) «hotstart» Taq-полимеразы и 3 мкл ДНК. ПЦР проводили в термоциклере 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  $\chi^2$  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 С ( $p < 0,05$ ) (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 |       | $\chi^2$ | 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. Уеяма, Н. Нishida [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-

**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<br>Мужчины – менее 37 |
| АЛТ, Ед/л                 | 20,38±3,42 | 22,69±0,57 | 22,86±0,32 | Женщины – менее 34<br>Мужчины – менее 45 |
| АСТ/АЛТ                   | 1,11±0,15  | 1,04±0,39  | 0,97±0,53  | 0,91-1,75                                |
| Нв. 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                                |

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 иметаболических 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 PNPLA3с 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, MR. Wing, JJ. 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. Guiu, 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, ND.Palmer, DW.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/