

УДК 616.36-003.826-071:575.113

В.П. Присяжнюк, Л.П. Сидорчук

АСОЦІАЦІЯ PRO12ALA ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНА PPAR-Г ІЗ БІОХІМІЧНИМИ ПОКАЗНИКАМИ КРОВІ ТА ЛІПІДНОГО СПЕКТРА У ПАЦІЄНТІВ ІЗ НЕАЛКОГОЛЬНОЮ ЖИРОВОЮ ХВОРОБОЮ ПЕЧІНКИ

Вищий державний навчальний заклад України "Буковинський державний медичний університет", м. Чернівці

Резюме. Досліджено зв'язок Pro12Ala поліморфізму гена PPAR-γ із біохімічними показниками крові та ліпідного спектра у пацієнтів із НАЖХП. Показано, що частота зустрічальності мінорного Ala-алеля гена PPAR-γ у зазначених пацієнтів достовірно не відрізняється від такої у практично здорових осіб. Активність АсАТ у пацієнтів із НАЖХП носіїв Ala-алеля була достовірно вища на 55,5 % ($p=0,007$), ніж у пацієнтів із Pro/Pro-генотипом. Водночас активність АлАТ у пацієнтів

із Ala-алелем була достовірно більша на 80,0 % ($p=0,03$), ніж у осіб із Pro/Pro-генотипом гена PPAR-γ. Також у зазначеної когорти пацієнтів із мінорним Ala-алелем активність ГГТ у 2,1 раза ($p=0,04$) переважала таку в осіб носіїв Pro/Pro-генотипу.

Ключові слова: неалкогольна жирова хвороба печінки, ген рецепторів активаторів проліферації пероксисом, поліморфізм.

Вступ. Одними із найбільш важливих генів, які регулюють адипо- та фіброгенез є гени, які кодують синтез рецепторів активаторів проліферації пероксисом (PPAR) [1]. PPAR експресуються в багатьох тканинах, зокрема в адипоцитах, гепатоцитах, міоцитах та ендотеліальних клітинах. Зазначені рецептори відіграють важливу роль у ліпідному та вуглеводному обміні, проте особливості їхнього впливу залежать від того, який саме тип рецепторів PPAR задіяний, та в яких тканинах проходить його активація [3]. PPAR-α в основному впливає на метаболізм жирних кислот і знижує рівень ліпідів. PPAR-β/δ бере участь в окисненні жирних кислот, переважно в скелетних і серцевому м'язі та водночас регулює рівень глюкози та холестерину в плазмі крові [6]. PPAR-γ у великій кількості розміщується в жировій тканині, де відіграє ключову роль у адипогенезі та регулюванні ліпідного обміну. Фізіологічна експресія PPARγ в адипоцитах забезпечує збалансовану і адекватну секрецію адипоцитокінів (адипонектину і лептину), які є посередниками інсуліну в периферичних тканинах [4], і таким чином запобігає розвитку НАЖХП [9].

Ген PPAR-γ має окремі промотери і п'ять екзонів, що призводить до утворення трьох мРНК: PPARγ1, PPARγ2 і PPARγ3. Всі ізоформи PPARγ-відіграють важливу роль у диференціації адипоцитів і метаболізмі глюкози [2]. Зокрема, відома властивість мРНК PPARγ2 запобігати розвитку ліпотоксичності, внаслідок надмірного розвитку жирової тканини [7].

Мета дослідження. Дослідити можливий зв'язок Pro12Ala поліморфізму гена PPAR-γ із біохімічними показниками крові та параметрами ліпідного спектра у хворих на НАЖХП.

Матеріал і методи. Досліджено Pro12Ala поліморфізм гена PPAR-γ у 64 хворих на НАЖХП та 20 практично здорових осіб (контрольна група). Усі пацієнти та практично здорові волонтери дали письмову інформовану згоду на участь у дослідженні. Кров брали вранці, натще із ліктьової вени в 1-2-й день перебу-

вання в стаціонарі до призначення лікування. Як антикоагулянт використовували 5 % розчин етилендіамінтетраацетату натрієвої солі. Біохімічні дослідження крові та вивчення ліпідного спектра проводилися на біохімічному аналізаторі "Accent-200" ("Cormay S.A.", Польща) за допомогою стандартних реактивів та методик на базі лабораторії Чернівецького обласного діагностичного центру.

Дослідження Pro12Ala поліморфізму гена PPAR-γ проводили у Державному закладі "Референс-центр з молекулярної діагностики МОЗ України" (м. Київ). Геномну ДНК для молекулярно-генетичного дослідження виділяли з периферичної крові за допомогою комерційної тест-системи "innuPREP Blood DNA Mini Kit" (Analytik Jena, Німеччина) з використанням центрифужних фільтрів. Для визначення поліморфних варіантів генів PPARγ (Pro12Ala) rs 1801282 використовували модифіковані протоколи з олігонуклеотидними праймерами [5, 8] із застосуванням методу полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) та наступним аналізом поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів (ПДРФ). Досліджувані ділянки гена ампліфікували за допомогою специфічних праймерів («Metabion», Німеччина), вказаних в таблиці 1.

Продукти ампліфікації фрагментів ДНК генів PPARγ підлягали гідролітичному розщепленню за допомогою ендонуклеаз рестрикції BstUI та Alw261 (BsmAI) («Thermo Scientific», США). Стан ампліфікаційних фрагментів аналізували в 2 % агарозному гелі, а рестрикційних фрагментів PPARγ (Pro12Ala) – у 3 % агарозному гелі (агароза фірми «Cleaver Scientific», Великобританія), з додаванням бромистого етидію, маркера молекулярної ваги GeneRuler 50 bp DNA Ladder («Thermo Scientific», США) та подальшою візуалізацією за допомогою комп'ютерної програми Vitran.

Тип розподілу даних визначали за порівнянням середньої арифметичної, моди і медіани, та за допомогою тестів Шапіро-Уїлка та Левене. Для визначення статистичних відмінностей між

двома незалежними групами використовували критерій Манна-Уїтні.

Результати дослідження та їх обговорення.

Досліджено Pro12Ala поліморфізм гена PPAR- γ у 64 хворих на НАЖХП та 20 практично здорових осіб (контрольна група). Розподіл генотипів поліморфізму гена наведений у таблиці 2.

Серед пацієнтів із НАЖХП носіїв Ala/Ala генотипу був 1 (1,6%), Pro/Ala – 12 (18,7 %), Pro/Pro – 51 (79,7 %); Ala-алель гена PPAR-g2 спостерігали в 14 (10,9 %) випадках із 128 виділених алелів, Pro-алель – у 114 (89,1 %), відповідно. У групі практично здорових гомозиготних носіїв Ala-алеля не виявили, 3 (15,0 %) обстежених осіб цієї групи були гетерозиготами, 85,0 % – гомозиготними носіями Pro-алеля, що вірогідно не відрізнялося від розподілу генотипів серед пацієнтів із НАЖХП.

Показники біохімічного аналізу крові хворих на НАЖХП залежно від Pro12Ala поліморфізму гена PPAR- γ наведено в таблиці 3. У зв'язку з тим, що кількість носіїв Ala/Ala-генотипу була обмежена (n=1), вважали за необхідне аналізувати показники за наявності мінорного Ala-алеля.

У хворих на НАЖХП носіїв як Pro-, так і Ala-алелів спостерігали підвищений вміст глюкози крові порівняно з практично здоровими особами на 39,6 % (p=0,0001) та 45,8 % (p=0,0005) відповідно (табл. 3). Достовірної різниці рівня глюкози в пацієнтів із НАЖХП залежно від генотипів гена PPAR-g не виявили. В обстежених пацієнтів із НАЖХП відзначали незначне, проте достовірне зменшення вмісту альбуміну в крові порівняно з контрольними показниками: у носіїв Pro/Pro-генотипу на 3,9 % (p=0,03), у таких із Ala-алелем – на 6,5 % (p=0,006) відповідно. Зазначені зміни рівнів альбуміну відбувалися на тлі тенденції до зростання вмісту загального білка в крові, яка, проте, не була достовірною. Для обстежених

хворих був характерний збільшений вміст сечової кислоти в крові порівняно з практично здоровими людьми: у хворих на НАЖХП носіїв Pro/Pro-генотипу – на 31,3 % (p=0,003), а в пацієнтів із Ala-алелем – на 48,2 % (p=0,001).

В обстежених пацієнтів із Ala-алелем спостерігали достовірно вищі показники активності трансаміназ порівняно з контрольними показниками, що не було властивим для пацієнтів з Pro/Pro-генотипом (табл. 3).

Зокрема, активність аспаратамінотрансферази (АсАТ) у пацієнтів із НАЖХП носіїв Ala-алеля була достовірно вища на 59,8 % (p=0,02) порівняно з такою у практично здорових осіб та на 55,5 % (p=0,007), ніж у пацієнтів із Pro/Pro-генотипом. Водночас, активність аланінамінотрансферази (АлАТ) у пацієнтів із Ala-алелем була достовірно більша у 2,1 раза (p=0,02) порівняно з контрольним значенням та на 80,0 % (p=0,03), ніж у пацієнтів із Pro/Pro-генотипом гена PPAR- γ . Також у зазначеній когорті пацієнтів із мінорним Ala-алелем діагностовано вищу активність гаммаглутамілтрансферази (ГГТ), яка переважала у 3,3 (p=0,001) раза таку в практично здорових осіб, та у 2,1 раза (p=0,04) – у хворих носіїв Pro/Pro-генотипу. У хворих на НАЖХП обох дослідних груп спостерігали вищу активність лактатдегідрогенази (ЛДГ (заг.)) порівняно з практично здоровими людьми, яка в носіїв Pro/Pro-генотипу на 25,0 % (p=0,006), а в пацієнтів із Ala-алелем – на 34,9 % (p=0,007) переважала відповідні контрольні показники. Відмінностей у активності цього ферменту між пацієнтами-носіями різних генотипів не виявляли. За рештою біохімічних показників крові відмінностей між пацієнтами із НАЖХП із різними генотипами не спостерігали.

Аналізуючи показники ліпідного профілю встановлено, що для пацієнтів із НАЖХП, обох дослідних груп, було властивим збільшення вмісту

Таблиця 1

Олігонуклеотидні праймери

Ген (поліморфізм)	Послідовність праймерів (5'3' -')	Розмір ампліфікованої ділянки ДНК
PPAR γ (Pro12Ala)	GCCAATTCAAGCCCAGTC - forward GATATGTTTGCAGACAGTGTATCAGTGAAGGAATCGCTT-TCC - reverse	270 п.н.
Внутрішній контроль ампліфікації	GCCCTCTGCTAACAAGTCCTAC GCCCTAAAAGAAAATCGCCAATC	350 п.н.

Таблиця 2

Розподіл Pro12Ala поліморфізму гена PPAR- γ у пацієнтів із неалкогольною жирною хворобою печінки та практично здорових осіб

Генотипи гена PPAR- γ , n (%)	Хворі на НАЖХП (n=64)		Практично здорові особи (n=20)	
	Абсолютна кількість, n	%	Абсолютна кількість, n	%
Ala/Ala	1	1,6	0	0,0
Pro/Ala	12	18,7	3	15,0
Pro/Pro	51	79,7	17	85,0

Таблиця 3

Біохімічні показники крові залежно від Pro12Ala поліморфізму гена PPAR-γ у пацієнтів із неалкогольною жировою хворобою печінки

Показник	Контрольна група, n=20	Хворі із НАЖХП, n=64	
		Носії Pro/Pro - генотипу, n=51	Носії Ala-алеля, n=13
Глюкоза, ммоль/л	4,8±0,19	6,7±0,39 p ₁ =0,0001	7,0 ± 0,88 p ₁ =0,0005, p ₂ >0,05
Білірубін загальний, мкмоль/л	10,3±0,76	12,0±0,82 p ₁ >0,05	14,5±1,85 p ₁ >0,05, p ₂ >0,05
Білірубін прямий, мкмоль/л	2,6±0,29	2,7±0,22 p ₁ >0,05	3,4±0,60 p ₁ >0,05, p ₂ >0,05
Сечова кислота, мкмоль/л	258,7±13,81	339,6±16,50 p ₁ =0,003	383,3±31,50 p ₁ =0,001, p ₂ >0,05
Альбумін, г/л	46,3±0,53	44,5±0,51 p ₁ =0,03	43,3±1,26 p ₁ =0,006, p ₂ >0,05
Загальний білок, г/л	70,8±0,93	71,4±0,86 p ₁ >0,05	72,9±1,47 p ₁ >0,05, p ₂ >0,05
Сечовина, ммоль/л	4,3±0,39	5,4±0,39 p ₁ >0,05	5,8±0,87 p ₁ >0,05, p ₂ >0,05
Креатинін, мкмоль/л	80,6±2,99	88,5±3,39 p ₁ >0,05	86,8±3,40 p ₁ >0,05, p ₂ >0,05
Аспаратамінотрансфераза, ОД/л	24,9±2,50	25,6±1,85 p ₁ >0,05	39,8±4,25 p ₁ =0,02, p ₂ =0,007
Аланінамінотрансфераза, ОД/л	22,1±3,01	26,0±2,95 p ₁ >0,05	46,8±6,31 p ₁ =0,02, p ₂ =0,03
Лактатдегідрогеназа (заг.), ОД/л	385,1±21,15	481,5±18,36 p ₁ =0,006	515,9±38,08 p ₁ =0,007, p ₂ >0,05
Лужна фосфатаза, ОД/л	84,7±5,40	85,6±3,69 p ₁ >0,05	91,7±9,80 p ₁ >0,05, p ₂ >0,05
Гаммаглутамілтрансфераза, ОД/л	25,3±2,85	39,0±2,98 p ₁ =0,006	83,1±14,71 p ₁ =0,001, p ₂ =0,04

Примітка. p₁ – достовірність відмінностей порівняно з показниками у групі практично здорових людей; p₂ – достовірність відмінностей порівняно з показниками у групі пацієнтів із НАЖХП із Pro/Pro-генотипом

Таблиця 4

Показники ліпідного профілю залежно від Pro12Ala поліморфізму гена PPAR-γ у пацієнтів із неалкогольною жировою хворобою печінки

Показник	Контрольна група, n=20	Пацієнти із НАЖХП, n=64	
		Носії Pro/Pro-генотипу, n=51	Носії Ala-алеля, n=13
Холестерол, ммоль/л	4,72±0,24	5,47±0,17 p ₁ =0,058	5,37±0,33 p ₁ >0,05, p ₂ >0,05
Триацилгліцероли, ммоль/л	1,26±0,13	1,99±0,14 p ₁ =0,001	2,26±0,37 p ₁ =0,02, p ₂ >0,05
Холестерол ЛПВЩ, ммоль/л	1,50±0,06	1,34±0,05 p ₁ =0,04	1,30±0,10 p ₁ =0,02, p ₂ >0,05
Холестерол ЛПНЩ, ммоль/л	3,03±0,23	3,21±0,16 p ₁ >0,05	3,25±0,43 p ₁ >0,05, p ₂ >0,05
Холестерол ЛПДНЩ, ммоль/л	0,62±0,07	0,90±0,07 p ₁ =0,03	1,07±0,18 p ₁ =0,052, p ₂ >0,05
Коефіцієнт атерогенності	2,44±0,21	3,13±0,10 p ₁ =0,008	3,22±0,27 p ₁ =0,05, p ₂ >0,05

Примітка. p₁ – достовірність відмінностей порівняно з показниками у групі практично здорових людей; p₂ – достовірність відмінностей порівняно з показниками у групі пацієнтів із НАЖХП із Pro/Pro-генотипом

ту триацилгліцеролів у крові порівняно з таким показниками в контрольній групі (табл. 4).

Зокрема, у носіїв Pro/Pro-генотипу він був на 57,9 % ($p=0,001$), а в пацієнтів із Ala-алелем – на 79,4 % ($p=0,02$) вищий за такий у практично здорових людей (табл. 4). Подібна тенденція була властива і для рівня холестеролу у крові, із вірогідністю близькою до достовірної. У пацієнтів із Pro/Pro-генотипом гена PPAR- γ відзначали достовірне зменшення вмісту холестеролу ЛПВЩ на 10,7 % ($p=0,04$), а в пацієнтів-носіїв Ala-алеля – на 13,4 % ($p=0,02$). Такі зміни відбувалися на тлі тенденції до підвищеного вмісту холестеролу ЛПНЩ та достовірного збільшення рівня холестеролу ЛПДНЩ (табл. 4).

Вищезазначені зміни ліпідного профілю у хворих на НАЖХП призводили до збільшення у них індексу атерогенності. Зокрема, у пацієнтів носіїв Pro/Pro-генотипу він на 28,3 % ($p=0,008$), а у хворих із Ala-алелем – на 32,0 % ($p=0,05$) переважав такий у практично здорових осіб.

Такі зміни ліпідного профілю загалом властиві для пацієнтів із НАЖХП та узгоджуються з даними інших дослідників [6, 9]. Достовірних відмінностей вищевказаних показників ліпідного профілю між хворими на НАЖХП, носіями різних генотипів Pro12Ala поліморфізму гена PPAR- γ не виявлено.

Висновки

1. Частота зустрічальності мінорного Ala-алеля гена PPAR- γ у пацієнтів із неалкогольною жировою хворобою печінки достовірно не відрізняється від такої у практично здорових осіб.

2. Носійство Ala-алеля гена PPAR- γ у хворих на неалкогольну жирову хворобу печінки асоціює із достовірно вищою активністю маркерів цитолітичного та холестатичного синдромів порівняно з носіями Pro/Pro-генотипу.

Перспективу подальших досліджень вбачаємо в поглибленні досліджень зв'язку гена

PPAR- γ з активністю цитолітичних, холестатичних і фіброзуючих процесів у печінці хворих на НАЖХП та інших хронічних дифузних захворювань печінки, застосуванні результатів таких досліджень для оптимізації терапевтичних схем лікування зазначеного контингенту осіб.

Література

1. Boitier E. Advances in understanding the regulation of apoptosis and mitosis by peroxisome-proliferator activated receptors in pre-clinical models: relevance for human health and disease / E. Boitier, J.C. Gautier, R. Roberts // *Comp Hepatol.* – 2003. – № 2 (1). – P. 3.
2. Feige J.N. From molecular action to physiological outputs: peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions / J.N. Feige, L. Gelman, L. Michalik // *Prog. Lipid Res.* – 2006. – № 2. – P. 120-159.
3. Grygiel-Górniak B. Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications – a review / B. Grygiel-Górniak // *Nutrition Journal.* – 2014. – Vol. 1. – P. 147-152.
4. Kintscher U. PPAR γ mediated insulin sensitization: the importance of fat versus muscle / U. Kintscher, R.E. Law // *Am J. Physiol Endocrinol Metab.* – 2005. – № 2. – P. 287-291.
5. Multiplex PCR detection of GSTM1, GSTT1, and GSTP1 Gene Variants / A. Buchard, J. Juan, K. Dalhoff // *J. of Molecular Diagnostics.* – 2007. – Vol. 9, № 5. – P. 612-617.
6. Omega-3 fatty acids for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease / M.N. Di Minno, A. Russolillo, R. Lupoli [et al.] // *World J. Gastroenterol.* – 2012. – № 18. – P. 5839-5847.
7. PPAR gamma 2 prevents lipotoxicity by controlling adipose tissue expandability and peripheral lipid metabolism / G. Medina-Gomez, S.L. Gray, L. Yetukuri [et al.] // *PLoS Genet.* – 2007. – № 3 (4). – P. 64.
8. PPAR-gamma Pro12Ala polymorphism and gastric cancer risk in a Turkish population / E. Canbay, O. Kurnaz, B. Canbay [et al.] // *Asian Pac J. Cancer Prev.* – 2012. – Vol. 13 (11). – P. 5875-5878.
9. Rogers C.Q. Adiponectin and alcoholic fatty liver disease / C.Q. Rogers, J.M. Ajmo, M. You // *IUBMB Life.* – 2008. – № 60. – P. 790-797.

АССОЦИАЦИЯ PRO12ALA ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА PPAR-Г ИЗ БИОХИМИЧЕСКИМИ ПОКАЗАТЕЛЯМИ КРОВИ И ЛИПИДНОГО СПЕКТРА У БОЛЬНЫХ С НЕАЛКОГОЛЬНОЙ ЖИРОВОЙ БОЛЕЗНИ ПЕЧЕНИ

В.П. Присяжнюк, Л.П. Сидорчук

Резюме. Исследована связь Pro12Ala полиморфизма гена PPAR- γ с биохимическими показателями крови и липидного спектра у больных с НАЖБП. Показано, что частота встречаемости мінорного Ala-аллеля гена PPAR- γ у них достоверно не отличается от таковой у практически здоровых лиц. Активность АсАТ у пациентов с НАЖБП носителей Ala-аллеля была достоверно выше на 55,5 % ($p=0,007$), чем у больных с Pro/Pro-генотипом. В то же время, активность АлАТ у пациентов с Ala-аллелей была достоверно больше на 80,0 % ($p=0,03$), чем у больных с Pro/Pro-генотипом гена PPAR- γ . Также в указанной когорте пациентов с мінорным Ala-аллелем диагностировано высокую активность ГГТ, которая в 2,1 раза ($p=0,04$) преобладала такую у больных носителей Pro/Pro-генотипа.

Ключевые слова: неалкогольная жировая болезнь печени, ген рецепторов активаторов пролиферации пероксисом, полиморфизм.

ASSOCIATION OF PRO12ALA POLYMORPHISM PPAR- γ GENE WITH BIOCHEMICAL PARAMETERS OF THE BLOOD AND LIPID SPECTRUM IN NONALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE PATIENTS*V.P. Prysiazhniuk, L.P. Sydorчук*

Abstract. The connection of Pro12Ala polymorphism of PPAR- γ gene with biochemical parameters of the blood and lipid spectrum in patients with NAFLD has been studied. The frequency of incidence of minor Ala-allele gene PPAR- γ in those patients was not significantly different from that in healthy individuals. Activity of AST in patients with NAFLD Ala-allele carriers was significantly higher at 55,5 % ($p=0,007$) than in patients with Pro / Pro-genotype. However, the ALT activity in patients with Ala-allele was significantly higher by 80,0 % ($p=0,03$) than in patients with Pro/Pro –genotype PPAR- γ gene. Also specified cohort of patients with minor Ala-allele diagnosed higher GGTP activity, which was by 2,1 times ($p=0,04$) prevailed such in patients with Pro/Pro-genotype carriers.

Key words: nonalcoholic fatty liver disease, peroxisome proliferation activator receptor gene, polymorphism.

Higher State Educational Institution of Ukraine
Bukovinian State Medical University (Chernivtsi)

Рецензент – проф. О.С. Хухліна

Buk. Med. Herald. – 2015. – Vol. 19, № 4 (76). – P. 149-153

Надійшла до редакції 16.06.2015 року