

© Коллектив авторов, 2014 г.
УДК [616.379-008.64:575]:577.113.5

**М. В. Ким, С. А. Скорюкова,
А. А. Быстрова, Е. И. Баранова,
С. Н. Пчелина**

ПОЛИМОРФИЗМ Q192R ГЕНА ПАРАОКСОНАЗЫ 1 У БОЛЬ- НЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА

Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова; Федеральный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова, Санкт-Петербург

ВВЕДЕНИЕ

Сахарный диабет (СД) — одно из наиболее распространенных хронических заболеваний. По данным Международной федерации сахарного диабета, в настоящее время насчитывается более 382 миллионов больных сахарным диабетом, а к 2035 г. их число увеличится до 592 миллионов человек. В 2013 г. в Российской Федерации зарегистрировано 3 миллиона 782 тысяч больных сахарным диабетом, из них 325 тысяч — пациенты с СД 1 типа и 3 миллиона 457 тысяч — пациенты с СД 2 типа. В Санкт-Петербурге в январе 2012 г. на учете у эндокринологов состояло 111 230 больных СД, 90 % из которых — пациенты с СД 2 типа [2].

Социальная значимость проблемы сахарного диабета 2 типа состоит прежде всего в том, что заболевание приводит к ранней инвалидизации и смертности. Продолжительность жизни более чем у 60 % больных ограничена быстро прогрессирующей ишемической болезнью сердца [10]. Высокий риск сердечно-сосудистых осложнений при СД 2 типа дал основание Американской кардиологической ассоциации причислить его к сердечно-сосудистым заболеваниям [8]. Факторами риска сердечно-сосудистых заболеваний при СД являются, в первую очередь, нарушения липидного обмена, которые диагностируются у 69 % больных, а также артериальная гипертензия, ожирение, курение, гиперкоагуляция, инсулинорезистентность, гиперинсулинемия, гипергликемия [8]. Характер макрососудистых поражений при СД 2 типа практически не отличается от атеросклеротического процесса, который имеет место у лиц без диабета, за исключением того, что развивается на 8–10 лет раньше.

Особенности нарушения липидного спектра крови у больных СД 2 типа настолько характерны, что получили название «Диабетической триады», которая представляет собой специфический вариант атерогенной дислипидемии, способствующей развитию атеросклероза независимо от уровня об-

щего холестерина (ОХ) и холестерина липопротеинов низкой плотности (ХС ЛПНП) [1, 15]. Компонентами диабетической дислипидемии при СД 2 типа являются: гипертриглицеридемия, повышение содержания «мелких, плотных» частиц ХС ЛПНП и снижение уровня холестерина липопротеинов высокой плотности (ХС ЛПВП), а также изменения их качественного состава.

Многочисленные эпидемиологические исследования позволяют полагать, что коррекция этих нарушений — повышение содержания ХС ЛПВП в крови может оказать положительное действие на частоту неблагоприятных сосудистых событий [3].

Известно, что ХС ЛПВП обладают антиатерогенными свойствами, осуществляя транспорт холестерина из периферических тканей в печень. Проведенные исследования свидетельствуют, что снижение ХС ЛПВП ассоциировано с повышенным риском развития атеросклероза [15, 9]. Уровень и функциональные свойства ХС ЛПВП во многом предопределены генетически.

К настоящему времени описано более 40 генетических детерминант, способных участвовать в регуляции системы ХС ЛПВП. Важнейшим белком, влияющим на уровень и активность ХС ЛПВП, является параоксоназа 1 (PON 1), которая во многом определяет их антиатерогенные свойства. Структура и функциональные свойства параоксоназы 1 генетически детерминированы. Установлено, что носительство определенных вариантов гена PON 1 ассоциируется со снижением активности фермента, в том числе у больных с сахарным диабетом 2 типа [14], что способствует активации процессов перекисного окисления липидов и снижению антиатерогенных свойств ХС ЛПВП [9]. Так, в настоящее время известно о наличии двух полиморфизмов гена PON1 кодирующей области: L55M — замена лецитина на метионин в позиции 55 и Q192R — замена глутамина на аргинин в позиции 192 [13, 6]. Установлено, что показатели липидного спектра у носителей различных генотипов гена PON 1 могут отличаться. Больные ИБС гомозиготные по R аллелю (192RR) имеют более высокую концентрацию ХС ЛПНП и более низкий уровень ХС ЛПВП. Вместе с тем, у больных СД 2 типа выявлены иные данные: носители 192 RR генотипа имеют более низкую концентрацию ХС ЛПНП и более высокие значения ХС ЛПВП по сравнению с носителями 192 QQ, 192 QR генотипов гена PON 1 [12].

Таким образом, результаты исследований, посвященных изучению вариантов дислипидемий у больных СД 2 типа — носителей различных генотипов гена PON 1 противоречивы. В связи с этим цель данного исследования — оценить показатели липидного спектра крови у больных с СД 2 типа в зависимости от носительства 192RR, 192QR или 192QQ генотипа гена PON 1.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Обследованы 120 человек: 27 мужчин (22,9 %) и 93 женщины (77,1 %), средний возраст которых составил $59,2 \pm 0,5$ года, не получавших гиполипидемическую терапию, находившихся на стабильной терапии бигуанидами, с уровнем гликированного гемоглобина менее 8,5 %. Не включались в исследование пациенты с тяжелыми осложнениями сахарного диабета, со значимой сопутствующей патологией, в том числе с гипотиреозом. Всем больным проведена оценка клинических и антропометрических данных, анализ показателей углеводного метаболизма, параметров липидного спектра крови, молекулярно-генетическое исследование.

Лабораторные исследования выполнялись в клиничко-диагностической лаборатории ФГБУ ФМИЦ им. В. А. Алмазова Минздрава Российской Федерации. Молекулярно-генетические исследования проводились в лаборатории высокотехнологичных методов молекулярного анализа ДНК отдела молекулярно-генетических технологий научно-исследовательского центра ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова.

Для исследования показателей липидного спектра проводился забор венозной крови утром натощак не менее чем через 12 часов после последнего приема пищи. Концентрации общего холестерина (ХС) и триглицеридов (ТГ), холестерина липопротеинов высокой плотности (ХС ЛПВП) определялись в сыворотке крови ферментным методом на биохимическом анализаторе COBAS INTEGRA 400 фирмы Roche (Швейцария), с использованием реагентов, калибраторов и контролей указанной фирмы, единицы измерения ммоль/л. Содержание ХС липопротеинов очень низкой плотности (ХС ЛПОНП) определяли расчетным методом по формуле $\text{ХС ЛПОНП} = \text{ТГ}/2,2$ (ммоль/л) и ХС ЛПНП по формуле Friedewald $\text{ХС ЛПНП} = \text{ОХС} - (\text{ХС ЛПВП} + \text{ТГ}/2,2)$, а коэффициент атерогенности (КА) по формуле $\text{КА} = (\text{ОХС} - \text{ХС ЛПВП})/\text{ХС ЛПВП}$ [4]. Уровень гликированного гемоглобина определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на анализаторе Bio-Rad D-10, единицы измерения %.

Для исключения нарушения функции щитовидной железы, как возможной причины нарушения липидного обмена, проводилось определение тиротропного гормона на иммуноферментном анали-

заторе ARCHITECT® i 1000SR компании Abbott (США), единицы измерения мкМЕ/л.

С целью молекулярно-генетического исследования у каждого пациента с сахарным диабетом 2 типа был осуществлен забор крови из вены в пробирки, содержащие 30 мкл ЭДТА 0.5М рН 8.0 в качестве антикоагулянта. Для выделения дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) из лимфоцитов периферической крови использовали фенол-хлороформный метод [5]. Аллели Q192 и 192R гена PON1 были определены методом оценки длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ). Для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) использованы праймеры: F5'TATTGTTGCTGTGGGACCTGAG3' и R5'CACGCTAAACCCAAATACATCTC3' (ЗАО «Синтол», Россия). Рестрикция проводилась с помощью эндонуклеазы Kzo9I («Сибензим», Россия). Электрофоретическое разделение рестрикционных фрагментов производилось в 8 % полиакриламидном геле [11].

Статистический анализ полученных данных проводился при помощи программы SPSS версия 16.0 для Windows. Для оценки достоверности различий исследуемых параметров между группами применялся непараметрический критерий Манна-Уитни. Для оценки различий распределения частоты признака использовался метод χ^2 , точный тест Фишера. Статистически достоверным считали различия при значениях $p < 0,05$. Данные в таблицах представлены в виде: среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего, в круглых скобках указана медиана.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Было проведено сопоставление данных, полученных при оценке распределения изученных генотипов у 120 обследованных больных с сахарным диабетом 2 типа и распределение генотипов в популяции (табл. 1). Q192R полиморфизм гена PON1 определен у 120 больных СД 2 типа и 305 здоровых людей сопоставимых по полу и возрасту. Анализ распределения генотипов 192QQ, 192QR, 192RR гена параоксоназы 1 среди здоровых лиц и пациентов с сахарным диабетом 2 типа выявил, что в группе больных СД 2 типа чаще встречается гомозиготный генотип 192RR. Так, в группе контроля его частота составила 3,3 %, а у больных СД 2 типа — 10 %. Частота генотипа 192QQ у здоровых лиц достигала 62,1 %, 192QR — 34,6 %, у больных СД 2 типа — 57,5 % и 32,5 % соответственно. Согласно критерию Манна — Уитни встречаемость генотипа 192RR гена параоксоназы 1 у больных сахарным диабетом 2 типа выше, чем у здоровых людей ($p = 0,016$). Достоверных различий в распределении генотипов 192QQ и 192QR при сравнении группы здоровых лиц с группой больных СД 2 типа выявлено не было.

Таблица 1

Распределение генотипов Q192R полиморфизма гена PON1 у больных сахарным диабетом 2 типа

Генотип	Пациенты с сахарным диабетом 2 типа (n = 120)	Группа сравнения (n = 305)	P
QQ	69 (57,5 %)	187 (62,1 %)	0,784
RR	12 (10 %)	10 (3,3 %)	0,016
QR	39 (32,5 %)	104 (34,6 %)	0,909

($p=0,784$, $p=0,909$, соответственно) (табл. 1). Полученные данные отличаются от результатов исследований других авторов, в которых различий в распределении генотипов не было выявлено.

Существенных различий в распределении 192QQ, 192QR, 192RR генотипов гена PON1 в зависимости от наличия ожирения, ишемической болезни сердца (ИБС) и хронической сердечной недостаточности (ХСН) у больных СД 2 типа не выявлено (табл. 2). Индекс массы тела (ИМТ), уровни гликированного гемоглобина и тиреотропного гормона в сыворотке крови обследованных также значимо не различались.

При анализе показателей липидного спектра крови у больных сахарным диабетом 2 типа значения показателей липидограммы у носителей различных генотипов гена PON1 различались.

Установлено, что пациенты-носители генотипа QQ гена PON1 имели достоверно более высокий уровень триглицеридов и ХС ЛПОНП, чем носители генотипа RR гена параоксоназы 1 ($p=0,025$, $p=0,024$, соответственно). Пациенты-носители генотипа QQ гена PON1 имели достоверно более высокий уровень общего холестерина, чем носители генотипа QR гена параоксоназы 1 ($p=0,021$). Достоверных различий в уровне ХС ЛПВП, ХС ЛПНП, коэффициента атерогенности у больных СД 2 типа – носителей 192QQ, 192QR, 192RR генотипов гена PON1 выявлено не было (табл. 3).

Анализ распределения генотипов 192QQ, 192QR, 192RR гена параоксоназы 1 среди здоровых лиц и пациентов с сахарным диабетом 2 типа выявил, что в группе больных СД 2 типа чаще встречается гомозиготный генотип 192RR. Данные, полученные при анализе распределения генотипов Q192R полиморфизма гена PON1 у больных сахарным диабетом 2 типа, полученные в нашей работе, отличаются от результатов исследований других авторов, в которых различий в распределении генотипов не было выявлено [12]. В какой-то степени этот факт может быть обусловлен сравнительно небольшим количеством больных СД 2 типа, включенных в данное исследование. Известно, что гомозиготы имеют большую устойчивость к ряду заболеваний, чем гетерозиготы. Повышенную устойчивость к заболеваниям гетерозигот объяс-

Таблица 2

Клиническая характеристика больных сахарным диабетом 2 типа с различными генотипами гена PON1

Генотип	Группа пациентов		P
	Пациенты с СД 2 типа и ХСН (n=51)	Пациенты с СД 2 типа без ХСН (n=69)	
QQ	29 (56,9 %)	40 (58 %)	0,928
QR	16 (31,4 %)	23 (33,3 %)	0,980
RR	6 (11,8 %)	6 (8,7 %)	0,846
Генотип	Пациенты с СД 2 типа и ИБС (n=82)	Пациенты с СД 2 типа без ИБС (n=38)	P
QQ	44 (53,7 %)	25 (65,8 %)	0,631
QR	28 (34,1 %)	11 (28,9 %)	0,836
RR	10 (12,2 %)	2 (5,3 %)	0,454
Генотип	Пациенты с СД 2 типа и ожирением (n=92)	Пациенты с СД 2 типа без ожирения (n=28)	P
QQ	53 (57,6 %)	16 (57,1 %)	0,876
QR	32 (34,8 %)	7 (25 %)	0,629
RR	7 (7,6 %)	5 (17,9 %)	0,294

няют более разнообразным, чем у гомозигот, составом аллоферментов, которые проявляют активность по отношению к широкому спектру экзогенных и эндогенных вредностей. Показано, что гидролизующая активность параоксоназы по отношению к ХС ЛПВП максимальна у носителей генотипа PON1 192RR, а у носителей генотипа PON1 192QQ эта активность в несколько раз ниже [7]. Вместе с тем, способность аллоферментов параоксоназы защищать ХС ЛПНП от окисления полностью противоположна параоксонгидролизующей активности. Так, PON1 у носителей 192R аллеля намного слабее защищала ХС ЛПНП от перекисидации, чем PON1 у носителей 192Q аллеля, что говорит о меньшей активности аллофермента PON1 R при метаболизировании липидных перекисей по сравнению с аллоферментом PON1 Q. Гетерозиготы, таким образом, обладают более надежной защитой от комбинированного воздействия неблагоприятных факторов внешней и внутренней среды,

Таблица 3

Показатели липидного спектра крови больных сахарным диабетом 2 типа носителей различных генотипов гена PON1

Показатель	Генотип			P
	QQ (n=69) 1	QR (n=39) 2	RR (n=12) 3	
Общий холестерин, ммоль/л	6,5±0,2; (m=6,6) (n=69)	6,0±0,3; (m=5,7) (n=39)	6,3±0,6; (m=5,7) (n=12)	p1,2=0,021 p1,3=0,377 p2,3=0,947
Триглицериды, ммоль/л	1,9±0,1; (m=1,9) (n=64)	1,8±0,1; (m=1,6) (n=36)	1,6±0,3; (m=1,2) (n=12)	p1,2=0,169 p1,3=0,025 p2,3=0,086
ХС ЛПВП, ммоль/л	1,4±0,1; (m=1,3) (n=37)	1,3±0,1; (m=1,2) (n=24)	1,3±0,2; (m=1,2) (n=8)	p1,2=0,497 p1,3=0,381 p2,3=0,811
ХС ЛПНП, ммоль/л	3,9±0,2; (m=4,1) (n=37)	3,9±0,3; (m=3,7) (n=24)	4,1±0,6; (m=3,5) (n=8)	p1,2=0,729 p1,3=0,929 p2,3=1,000
ХС ЛПОНП, ммоль/л	0,9±0,04; (m=0,9) (n=64)	0,8±0,1; (m=0,8) (n=36)	0,7±0,1; (m=0,5) (n=12)	p1,2=0,170 p1,3=0,024 p2,3=0,086
Коэффициент атерогенности	3,8±0,2; (m=3,7) (n=42)	3,9±0,4; (m=3,6) (n=27)	4,0±0,6; (m=3,6) (n=10)	p1,2=0,927 p1,3=0,898 p2,3=0,945

Примечание: n – количество больных; m – медиана; p – достоверность.

большей адаптивностью, чем гомозиготы. В свете этой информации становится понятно, почему гетерозиготы проявляют повышенную устойчивость к заболеванию.

При анализе показателей липидного спектра крови у больных сахарным диабетом 2 типа — носителей различных генотипов гена параоксоназы 1 выявлена ассоциация атерогенных изменений липидограммы с носительством 192 QQ генотипа гена PON 1, что соответствует данным других исследований [12].

ВЫВОДЫ

1. 192 RR генотип гена параоксоназы 1 у больных сахарным диабетом 2 типа встречался чаще, чем у здоровых людей. Распределение 192QQ и 192QR генотипов гена PON1 у больных СД 2 типа и здоровых людей не различалось.

2. У больных сахарным диабетом 2 типа носительство генотипа 192QQ гена параоксоназы 1 ассоциируется с более высокими значениями общего холестерина, триглицеридов и холестерина липопротеинов очень низкой плотности, что можно рассматривать как фактор риска развития атеросклероза и ишемической болезни сердца.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дегов И. И., Александров А. А. Проблемы и перспективы гиперлипидемической терапии при сахарном диабете // Сахарный диабет. — 2000. — № 2. — С. 9–11.
2. Дегов И. И., Шестакова М. В. Результаты реализации подпрограммы «Сахарный диабет» федеральной целевой программы «Предупреждение и борьба с социально значимыми заболеваниями 2007–2012 годы». — М.: ЭНЦ, 2012. — С. 52.
3. Кисляк О. А., Верещагина Г. С., Хаутиева Ф. М. Ишемическая болезнь сердца и статины // Болезни сердца и сосудов. — 2009. — № 1. — С. 3.
4. Климов А. Н., Перова Н. В., Трюфанов В. Ф. и др. Липиды и липопротеиды плазмы крови в популяциях мужчин и женщин в возрастном аспекте // Эпидемиол. и факторы риска ишемической болезни сердца. — 1989. — С. 36–57.
5. Blin N., Stafford D. W. A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes // Nucleic. Acids Res. — 1976. — Vol. 3. — № 99. — P. 2303–2308.
6. Costa L. G., Giordano G., Furlong C. E. Pharmacological and dietary modulators of paraoxonase 1 (PON1) activity and expression: the hunt goes on // Biochem. Pharmacol. — 2011. — Vol. 81. — P. 337–3044.
7. Durrington P. N., Mackness B., Mackness M. I. Paraoxonase and atherosclerosis // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. — 2001. — Vol. 21. — P. 473.
8. Hansson L., Zanchetti A., Carruthers S. G. et al. Effects of intensive blood pressure lowering and low-dose aspirin in patients with hypertension: principal results of the Hypertension Optimal Treatment (HOT) randomized trial // Lancet. — 1998. — Vol. 351. — P. 1755–1762.

9. Hicham B., Claudia N. M. et al. Health benefits of high-density lipoproteins in preventing cardiovascular diseases // Journal of Clinical Lipidology. — 2012. — Vol. 6. — P. 524–533.

10. Mercer B. N., Morais S., Cubbon R. M., Kearney M. T. Diabetes mellitus and the heart // Int. J. Clin. Pract. — 2012. — Vol. 66 (7). — P. 640–647.

11. Oliveira S. A., Mansur A. P., Ribeiro C. C. et al. PON1 M/L55 mutation protects high-risk patients against coronary artery disease // Int. J. Cardiol. — 2004. — Vol. 94. — № 1. — P. 73–77.

12. Paragh G., Harangi M., Mirdamadi H. Z. et al. The human paraoxonase 1 phenotype modifies the effect of statins on paraoxonase activity and lipid parameters // Br. J. Clin. Pharmacol. — 2008. — Vol. 66. — P. 366–373.

13. Precourt L. P., Amre D., Denis M. C. et al. The three-gene paraoxonase family: physiologic roles, actions and regulation // Atherosclerosis. — 2011. — Vol. 214. — P. 20–36.

14. Sampson M. J., Brasch S. Paraoxonase-1 (PON-1) genotype and activity and *in vivo* oxidized plasma low-density lipoprotein in Type II diabetes // Clinical Science. — 2005. — P. 189–197.

15. Zeljko R., Alberico L. C. et al. The Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS) // ESC/EAS Guidelines. — 2011. — P. 1773–1775.

РЕЗЮМЕ

М. В. Ким, С. А. Скорюкова, А. А. Быстрова, Е. И. Баранова, С. Н. Пчелина

Полиморфизм Q192R гена параоксоназы 1 у больных сахарным диабетом 2 типа

В статье рассматриваются особенности липидного обмена у больных сахарным диабетом 2 типа — носителей различных генотипов гена параоксоназы 1. Известно, что фермент параоксоназа 1 (PON1) играет ключевую роль в регуляции процессов перекисного окисления липидов и его активность генетически детерминирована. В результате исследования выявлено, что полиморфные варианты гена PON1 могут определять формирование атерогенных изменений липидного спектра крови у больных сахарным диабетом (СД) 2 типа.

Ключевые слова: сахарный диабет, дислипидемия, атеросклероз, сердечно-сосудистые заболевания, ген параоксоназы 1.

SUMMARY

M. V. Kim, S. A. Skoryukova, A. A. Bystrova, E. I. Baranova, S. N. Pchelina

Paraoxonase 1 gene polymorphisms in patients with type 2 diabetes mellitus

The article deals with the features of lipid metabolism in patients with type 2 diabetes — the carriers of different genotypes of paraoxonase 1 gene. Known that the enzyme paraoxonase 1 (PON1) plays a key role in the regulation of lipid peroxidation and its activity is genetically determined. The investigation revealed that the PON1 gene's polymorphic variants may determine the formation of atherogenic changes in lipid profile in patients with diabetes mellitus (DM) type 2.

Key words: diabetes mellitus, dyslipidemia, atherosclerosis, cardiovascular disease, paraoxonase 1 gene.