

Исследование ассоциации полиморфизма Gln223Arg гена рецептора лептина с ожирением и неалкогольной жировой болезнью печени

А. В. Морозова, Н. В. Мальцева, Я. А. Горбатовский,
О. Ф. Лыкова, С. В. Архипова

ГБОУ ДПО «Новокузнецкий государственный институт усовершенствования врачей»
Минздрава России, Новокузнецк, Российская Федерация

Association of leptin receptor Gln223Arg genetic polymorphism with obesity and non-alcoholic fatty liver disease

A. V. Morozova, N. V. Mal'tseva, Y. A. Gorbatovsky, O. F. Lykova, S. V. Arkhipova

Novokuznetsk State Institute of Postgraduate Medicine»
Ministry of HealthCare of Russia, Novokuznetsk, Russian Federation

Цель исследования. Поиск ассоциации полиморфизма Gln223Arg в гене рецептора лептина (LEPR) с ожирением и неалкогольной жировой болезнью печени (НАЖБП).

Материал и методы. Обследованы 107 пациентов с НАЖБП, 81 пациент с алкогольной болезнью печени (АБП) и 117 лиц без патологии печени (группа контроля). Критерием ожирения тела был индекс массы тела (ИМТ) $\geq 30,0$. В сыворотке крови обследуемых содержание холестерина и триглицеридов определяли ферментным колориметрическим методом, концентрацию лептина — иммуноферментным методом. Генотипирование по полиморфизму Gln223Arg в гене LEPR проводили методом аллель-специфической полимеразной цепной реакции.

Результаты. В группе контроля и у пациентов с АБП не обнаружено связи ожирения с полиморфизмом Gln223Arg гена LEPR. У пациентов с НАЖБП без ожирения генотип Arg223Arg, как и аллель 223Arg, встречался реже, чем в группе контроля — в 3 ($P < 0,05$) и 1,5 ($P < 0,05$) раза соответственно. Частота данного генотипа/аллеля также

Aim of investigation. Investigation of association of leptin receptor (LEPR) gene Gln223Arg polymorphism with obesity and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD).

Material and methods. Overall 107 patients with NAFLD, 81 patient with alcoholic liver disease (ALD) and 117 patients without liver diseases (control group) were investigated. Obesity criterion was body the body mass index (BMI) $\geq 30,0$. Cholesterol and triglycerides serum levels were estimated by enzyme colorimetric method, leptin concentration — by immunoenzyme method. Genotyping for LEPR Gln223Arg gene polymorphism was carried out by allele — specific polymerase chain reaction.

Results. In control group and ALD patients no correlation of obesity with LEPR Gln223Arg gene polymorphism was revealed. In NAFLD patients without obesity Arg223Arg genotype, as well as 223Arg allele, was less frequent, than in control group — 3 times ($P < 0,05$) and 1,5 times ($P < 0,05$) respectively. Frequency of this genotype / allele was also significantly less in NAFLD group without obesity, than in those with obesity. Mean serum cholesterol level at NAFLD was higher, than at

Морозова Александра Валерьевна — аспирант кафедры терапии ГОУ ДПО НГИУВ. Контактная информация: sasha_8512@mail.ru; 654005, г. Новокузнецк, пр. Строителей, 5

Morozova Alexandra V — post-graduate student, chair of internal diseases, Novokuznetsk State Institute of Postgraduate Medicine. Contact information: sasha_8512@mail.ru; 654005, Novokuznetsk, Stroiteley pr., 5

Мальцева Нина Васильевна — доктор биологических наук, заведующая научно-исследовательской лабораторией молекулярной биологии ГОУ ДПО НГИУВ. Контактная информация: ninamaltseva@nm.ru; 654005, г. Новокузнецк, пр. Строителей, 5

Mal'tseva Nina V — Dr.Sci.Biol., head of Research laboratory of molecular biology, State educational government-financed institution of complementary professional education, Novokuznetsk State Institute of Postgraduate Medicine. Contact information: ninamaltseva@nm.ru; 654005, Novokuznetsk, Stroiteley pr., 5

была значимо меньше в группе с НАЖБП у лиц без ожирения, чем с ожирением.

Уровень холестерина в сыворотке крови при НАЖБП в среднем оказался выше, чем при АБП ($P < 0,05$), причем у носителей генотипа Gln223Gln данный показатель был максимальным по сравнению с соответствующим показателем в других группах.

У лиц с НАЖБП вариант 223Arg встречался реже (49,5%), чем вариант 223Gln, в отличие от других групп. Частота аллеля 223Gln у женщин с НАЖБП была в 1,5 раза выше ($P < 0,05$), чем у женщин с АБП, и в 1,3 раза выше ($P < 0,05$), чем у женщин из группы контроля. Соответственно частота генотипа Gln223Gln у женщин с НАЖБП превышала соответствующий показатель у женщин с АБП в 1,5 раза ($P < 0,01$), у женщин из группы контроля в 1,3 раза ($P < 0,05$) и у мужчин с НАЖБП в 3 раза ($P = 0,05$).

Выводы. Носительство варианта 223Gln полиморфизма Gln223Arg в гене LEPR может способствовать повышению уровня холестерина и развитию неалкогольной жировой болезни печени и в отсутствие ожирения, особенно у женщин.

Ключевые слова: ген рецептора лептина, полиморфизм Gln223Arg, неалкогольная болезнь печени, ожирение, лептин, холестерин, триглицериды.

Неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП) относится к группе заболеваний, обусловленных нарушением питания и обмена веществ. В развитых государствах заболеваемость НАЖБП составляет около 25%, среди тучных людей 57–74%, что дает основание расценивать ожирение как основной фактор риска ее развития. Полагают, что гормон лептин, участвующий в регуляции энергетического обмена и массы тела, причастен к развитию ожирения [10], так как влияет на экспрессию гипоталамических нейропептидов [17], в частности, блокируя синтез и высвобождение нейропептида Y, который вызывает чувство голода.

Лептин продуцируется различными клетками, среди которых к основным продуцентам относятся адипоциты, и секретируется в циркуляцию. Влияние лептина в клетках-мишенях осуществляется через селективное связывание и активацию им специфического рецептора, находящегося на клеточной мембране и принадлежащего к семейству рецепторов цитокинов. В гене *рецептора лептина* (LEPR) обнаружены полиморфизмы, в том числе Gln223Arg, который приводит к замене аминокислоты во внеклеточной области рецептора, общей для всех его изоформ. Полиморфизмы в LEPR могут быть ассоциированы с *индексом массы тела* (ИМТ) и уровнем сывороточного лептина.

В кровяном русле гормон циркулирует преимущественно в комплексе с растворимой формой рецептора лептина [5], который представляет

собой его внеклеточный домен [7], и связывает лептин с аффинностью, сходной с таковой у мембранных рецепторов [8]. Поэтому слабая лептин-связывающая активность сыворотки крови может отражать нарушение функции рецептора, ассоциированное с генотипом, т. е. функциональные вариации в гене рецептора лептина могут способствовать развитию ожирения [12].

Некоторые авторы отмечают, что слабая лептин-связывающая активность сыворотки крови присуща носителям мутантного 223Arg-аллеля полиморфизма Gln223Arg гена LEPR. При этом оказалось, что носители гомозиготного генотипа Arg223Arg менее активны физически, медленнее расходуют энергию и имеют больший размер абдоминальных адипоцитов, чем носители генотипа Gln223Gln [14]. Однако другие исследователи [6] считают, что носители аллеля дикого типа 223Gln (генотипы Gln223Gln и Gln223Arg) имеют более высокий процент жира и уровень лептина в крови.

Conclusions. Carriage of 223Gln variant of LEPR Gln223Arg gene polymorphism can promote increase of cholesterol level and development of non-alcoholic fatty liver disease in absence of obesity as well, is especial in women.

Key words: leptin receptor gene, Gln223Arg polymorphism, non-alcoholic liver disease, obesity, leptin, cholesterol, triglycerides.

собой его внеклеточный домен [7], и связывает лептин с аффинностью, сходной с таковой у мембранных рецепторов [8]. Поэтому слабая лептин-связывающая активность сыворотки крови может отражать нарушение функции рецептора, ассоциированное с генотипом, т. е. функциональные вариации в гене рецептора лептина могут способствовать развитию ожирения [12].

Некоторые авторы отмечают, что слабая лептин-связывающая активность сыворотки крови присуща носителям мутантного 223Arg-аллеля полиморфизма Gln223Arg гена LEPR. При этом оказалось, что носители гомозиготного генотипа Arg223Arg менее активны физически, медленнее расходуют энергию и имеют больший размер абдоминальных адипоцитов, чем носители генотипа Gln223Gln [14]. Однако другие исследователи [6] считают, что носители аллеля дикого типа 223Gln (генотипы Gln223Gln и Gln223Arg) имеют более высокий процент жира и уровень лептина в крови.

Целью работы явился поиск ассоциации полиморфизма Gln223Arg в гене LEPR с ожирением и НАЖБП.

Материал и методы исследования

Обследовано 306 человек, среди которых 107 включены в основную группу — пациенты с НАЖБП, 18 (17%) мужчин и 89 (83%) женщин, группу сравнения составили пациенты с *алкогольной болезнью печени* (АБП), 56 (69%) мужчин

и 25 (31%) женщин) и 118 человек вошли в группу контроля — лица без патологии печени, 47 (40%) мужчин и 70 (60%) женщин. Средний возраст всех обследованных составил $58,00 \pm 0,85$ (25–87) года, у мужчин — $54,30 \pm 1,40$ (27–82), у женщин — $60,40 \pm 1,02$ (37–87).

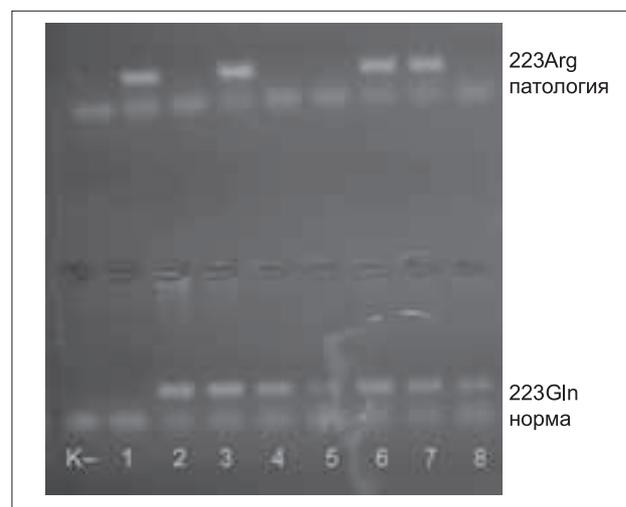
НАЖБП диагностировали путем исключения вирусного, алкогольного, аутоиммунного, метаболического, лекарственного поражения печени, а также по характерным изменениям показателей липидного обмена — *холестерина* (ХС), *триглицеридов* (ТГ), липопротеинов высокой плотности, нарушениям углеводного обмена, наличию у пациентов компонентов метаболического синдрома, признаков стеатоза печени по данным УЗИ органов брюшной полости.

АБП диагностировали на основании сбора алкогольного анамнеза (опрос пациента и его родственников), наличия характерных стигм заболевания (одутловатость лица, контрактура Дюпюитрена, телеангиоэктазии, гинекомастия, периферическая полинейропатия), по лабораторным показателям (повышение уровней гамма-глутамилтранспептидазы, аланинаминотрансферазы, аспартатамино-трансферазы), характерным УЗ-признакам (жировой гепатоз/гепатомегалия/проявления цирроза печени).

Критерием ожирения был $ИМТ \geq 30,0$ кг/м². В сыворотке крови обследуемых содержание ХС и ТГ определяли ферментным колориметрическим методом, а концентрацию лептина — иммуноферментным методом с помощью набора реагентов DRG Leptin (Sandwich) ELISA (Germany).

Молекулярно-генетические исследования проводили с использованием аллель-специфической *полимеразной цепной реакции* (ПЦР). Геномную ДНК выделяли из клеток периферической крови с помощью коммерческого реагента «ДНК-экспресс-кровь» (НПФ «Литех», Москва). Определение полиморфизма Gln223Arg (Q223R, 668A>G, rs1137101) гена рецептора лептина LEPR осуществляли с использованием соответствующих коммерческих комплектов реагентов для выявления мутаций (полиморфизмов) в геноме человека — «SNP-экспресс» (НПФ «Литех», Москва). Согласно инструкции к комплектам «SNP-экспресс», с образцом выделенной ДНК проводили одновременно две реакции амплификации — с двумя парами аллель-специфичных праймеров на параллельное выявление аллелей дикого и мутантного типа (норма и патология соответственно). Амплификацию проводили в автоматическом термоциклере Терцик («ДНК-Технология», Москва). Температурный режим программы амплификации состоял из 1 цикла при 93°C в течение 1 мин, 35 циклов с этапами денатурации ДНК в течение 10 с при 93°C, отжига праймеров в течение 10 с при 64°C, синтеза цепей в течение 20 с при 72°C и 1 цикла при 72°C

в течение 1 мин. Анализ ПЦР-продуктов проводили после их электрофоретического разделения в 100 мл 3% агарозного геля на 50xTAE-буфере, в который до застывания вносили 10 мкл 1% раствора бромистого этидия. В каждом геле вырезали два ряда лунок — для нормы и патологии. Гели фотографировали при помощи цифрового фотоаппарата Canon PowerShot A590 IS в проходящем ультрафиолетовом свете с длиной волны 310 нм. Фрагменты анализируемой ДНК проявлялись в виде светящихся полос (см. рисунок).



Электрофореграмма продуктов амплификации полиморфного локуса Gln223Arg LPR гена:

К — отрицательный контрольный образец; дорожка 1 — Arg223Arg; дорожки 3, 6, 7 — Gln223Arg; дорожки 2, 4, 5, 8 — Gln223Gln

Забор биологического материала и молекулярно-генетические исследования осуществляли на основании информированного согласия обследуемых лиц.

Математическую обработку результатов исследований проводили с помощью пакетов статистических программ InStatII, Microsoft Excel. Стандартная обработка включала подсчет средних арифметических величин (M) и стандартных ошибок среднего (m). Значимость различий показателей в группах оценивали с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни. Соответствие распределения частот генотипов равновесию Харди–Вайнберга определяли по стандартным формулам. Достоверность различий в распределении частот встречаемости аллелей и генотипов между группами больных и здоровых индивидов оценивали двусторонним точным критерием Фишера. Частота встречаемости аллеля/генотипа определялась по соотношению количества его носителей к общему количеству носителей тестируемых аллелей/генотипов в исследуемой выборке. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05.

Таблица 1

Распределение генотипов и аллельная частота полиморфизма Gln223Arg в LEPR гене у обследуемых лиц в зависимости от ожирения

| Генотипы, аллели | Показатели | Контроль | | | АБП | | | НАЖБП | | |
|------------------|------------|----------|------|------|------|------|------|------------------------|------|------|
| | | Все | Б/о | С/о | Все | Б/о | С/о | Все | Б/о | С/о |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
| | <i>n</i> | 116 | 106 | 10 | 80 | 55 | 25 | 107 | 22 | 85 |
| | % | — | 91 | 9 | — | 69 | 31 | — | 21 | 79 |
| Gln223Gln | <i>n</i> | 32 | 29 | 3 | 17 | 11 | 6 | 34 | 9 | 25 |
| | <i>p</i> | — | 0,27 | 0,30 | — | 0,20 | 0,24 | — | 0,41 | 0,29 |
| Gln223Arg | <i>n</i> | 46 | 42 | 4 | 37 | 28 | 9 | 44 | 11 | 31 |
| | <i>p</i> | — | 0,40 | 0,40 | — | 0,51 | 0,36 | — | 0,50 | 0,37 |
| Arg223Arg | <i>n</i> | 38 | 35 | 3 | 26 | 16 | 10 | 31 | 2 | 29 |
| | <i>p</i> | — | 0,33 | 0,30 | — | 0,29 | 0,40 | — | 0,09 | 0,34 |
| 223Gln | <i>n</i> | 110 | 100 | 10 | 71 | 50 | 21 | 110 | 29 | 81 |
| | <i>p</i> | 0,47 | 0,47 | 0,5 | 0,44 | 0,45 | 0,42 | 0,51 | 0,66 | 0,46 |
| 223Arg | <i>n</i> | 122 | 112 | 10 | 89 | 60 | 29 | 104 | 15 | 89 |
| | <i>p</i> | 0,53 | 0,53 | 0,5 | 0,56 | 0,55 | 0,58 | 0,49 | 0,34 | 0,54 |
| | | | | | | | | P ₄ =0,038 | | |
| | | | | | | | | P ₁₀ =0,033 | | |
| | | | | | | | | P ₄ =0,031 | | |
| | | | | | | | | P ₁₀ =0,042 | | |

Примечание. P — достоверность различий; *n* — количество обследованных лиц, *p* — частота встречаемости аллеля/генотипа; Б/о — лица без ожирения, С/о — лица с ожирением.

Результаты исследования и их обсуждение

1. Исследование связи полиморфизма Gln223Arg гена LEPR с ожирением

Наши результаты показали (табл. 1), что лиц с ожирением в группах с АБП и НАЖБП было значительно больше, чем в группе контроля — в 3,4 и 8,7 раза соответственно ($P < 0,0001$), а в группе с НАЖБП пациентов с ожирением было больше, чем в группе с АБП, в 2,5 раза ($P < 0,0001$). Среди лиц с ожирением и без него в группах контроля и сравнения распределение всех трех искомым генотипов было сходным, подчинялось равновесию Харди–Вайнберга ($P > 0,05$) и связь полиморфизма Gln223Arg с ожирением отсутствовала, что соответствует данным литературы [3,15].

В основной группе наблюдалось отклонение частот искомым генотипов от равновесия Харди–Вайнберга у обследуемых с ожирением и у женщин ($P < 0,05$), по-видимому, вследствие того, что у лиц без ожирения частота носительства аллеля 223Gln превышала частоту носительства аллеля 223Arg почти в 2 раза, в то время как в группе контроля и в группе АБП эти частоты были сравнимы. К тому же, генотип Arg223Arg, как и аллель 223Arg, у пациентов с НАЖБП без ожирения встречался значительно реже, чем в контроль-

ной группе — в 3 ($P < 0,0001$) и 1,5 ($P = 0,01$) раза соответственно. Частота данного генотипа/аллеля также была значительно меньше у лиц без ожирения, чем с ожирением, в группе НАЖБП. Это дает основание предполагать, что носительство варианта 223Gln даже у лиц без ожирения способствует развитию НАЖБП.

2. Исследование связи полиморфизма Gln223Arg гена LEPR с показателями жирового обмена

Показатели содержания ХС и ТГ в сыворотке крови обследованных представлены в табл. 2. Они демонстрируют, что уровень ХС у лиц с НАЖБП значительно выше, чем у пациентов с АБП и в группе контроля за счет носителей генотипа Gln223Gln. Содержание ТГ было повышено у всех лиц из основной группы независимо от исследуемых генотипов.

3. Исследование связи содержания лептина в сыворотке крови с ожирением и НАЖБП

Результаты по оценке содержания лептина в сыворотке крови у мужчин и женщин обследуемых групп и в зависимости от ожирения приведены в табл. 3. Они показывают, что в среднем концентрация лептина у лиц с АБП и НАЖБП увеличена. АБП сопровождалась ростом количества лептина в сыворотке крови в среднем в 2 раза у мужчин и в 1,5 раза у женщин по сравнению с контролем. В группе НАЖБП показатель лепти-

Таблица 2

Содержание холестерина (ммоль/л) и триглицеридов (ммоль/л) в сыворотке крови обследуемых лиц при носительстве различных генотипов полиморфизма Gln223Arg гена LEPR

| Показатели | Контроль | | АБП | | НАЖБП | |
|--------------------------|-----------|-----------|-----------|--------------|-------------------------|---------------------------|
| | ХС | ТГ | ХС | ТГ | ХС | ТГ |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| У всех обследованных лиц | | | | | | |
| <i>M±m</i> | 5,25±0,12 | 1,19±0,05 | 5,25±0,29 | 1,48±0,13 | 5,70±0,13 | 1,89±0,13 |
| <i>Min–Max</i> | 2,1–7,6 | 0,5–2,8 | 1,7–13,2 | 0,3–5,7 | 2,4–8,5 | 0,6–5,3 |
| <i>n</i> | 86 | 86 | 54 | 54 | 92 | 91 |
| | | | | | $P_2=0,011$ $P_4=0,02$ | $P_3=0,002$ $P_5=0,0008$ |
| У носителей Gln223Gln | | | | | | |
| <i>M±m</i> | 5,11±0,22 | 1,21±0,03 | 4,92±0,38 | 1,70±0,28 | 5,88±0,22 | 1,82±0,15 |
| <i>Min–Max</i> | 2,1–7,1 | 0,5–2,1 | 2,6–6,9 | 0,6–3,9 | 3,5–8,5 | 0,6–3,4 |
| <i>n</i> | 26 | 26 | 16 | 13 | 26 | 26 |
| | | | | | $P_2=0,017$ $P_4=0,024$ | $P_3=0,002$ |
| У носителей Gln223Arg | | | | | | |
| <i>M±m</i> | 5,24±0,18 | 1,08±0,07 | 5,03±0,39 | 1,32±0,20 | 5,44±0,21 | 1,97±0,17 |
| <i>Min–Max</i> | 3,2–7,4 | 0,6–2,2 | 1,7–10,2 | 0,5–5,7 | 2,4–7,5 | 0,6–5,3 |
| <i>n</i> | 32 | 32 | 26 | 26 | 36 | 35 |
| | | | | $P_3=0,0001$ | | $P_3=0,0001$ $P_5=0,0005$ |
| У носителей Arg223Arg | | | | | | |
| <i>M±m</i> | 5,39±0,21 | 1,33±0,12 | 5,91±0,70 | 1,56±0,22 | 5,84±0,22 | 1,86±0,16 |
| <i>Min–Max</i> | 3,3–7,6 | 0,6–2,8 | 0,4–2,8 | 2,3–13,2 | 3,1–8,3 | 0,6–4,8 |
| <i>n</i> | 28 | 28 | 15 | 15 | 30 | 30 |
| | | | | | | $P_3=0,012$ |

Примечание. P – достоверность различий данных по строкам; *Min–Max* – диапазон значений от минимального до максимального в данной выборке; *n* – количество обследованных лиц.

на был максимален как по индивидуальной вариабельности, так и в среднем превышал таковой в контроле (у мужчин в 4 раза, у женщин в 2,6 раза) и в группе сравнения (у мужчин в 2 раза, у женщин в 1,7 раза).

Ожирение сопровождалось повышением уровня лептина во всех исследуемых группах. В группе АБП у мужчин с ожирением количество лептина было выше, чем у мужчин без ожирения, в 2,7 раза ($P<0,0001$), у женщин соответственно в 2 раза ($P=0,056$). В группе лиц с НАЖБП у мужчин с ожирением и без него не было выявлено статистически значимой разницы в количестве лептина, возможно, из-за малой выборки и различий в степени ожирения, которые не могли быть проанализированы в данном исследовании, но у женщин с ожирением уровень лептина был повышен в 1,4 раза ($P=0,037$) по сравнению с женщинами без ожирения. В группе контроля ожирение у женщин также сопровождалось повышением концентрации лептина почти в 2 раза ($P=0,0075$).

Таким образом, содержание лептина в сыворотке крови сопряжено с ожирением тела и стеатозом печени. Однако в группе НАЖБП уро-

вень лептина в среднем был выше не только у мужчин и женщин с ожирением по сравнению с соответствующими лицами в других группах, но и у пациентов обоего пола без ожирения. Это позволяет полагать, что не только ожирение приводит к увеличению содержания лептина, но и другие факторы. Анализ возможного вклада носительства тестируемых генотипов Gln223Arg гена LEPR в повышение уровня лептина у обследуемых лиц представлен ниже.

4. Исследование связи полиморфизма Gln223Arg гена LEPR с содержанием лептина в сыворотке крови

Данные, касающиеся содержания лептина в сыворотке крови носителей различных генотипов по полиморфному локусу Gln223Arg в гене LEPR, представлены в табл. 4. Установлено, что в группе контроля как у мужчин, так и у женщин уровень лептина не отличается у носителей генотипов Gln223Gln и Gln223Arg. Носители гомозиготного мутантного генотипа Arg223Arg демонстрировали меньшее количество лептина, чем носители Gln223Gln ($P=0,043$) и Gln223Arg – в среднем мужчины в 2 раза, женщины – на 20%.

Таблица 3

Содержание лептина (нг/мл) в сыворотке крови обследуемых мужчин и женщин в зависимости от ожирения

| Показатели | Контроль | | АБП | | НАЖБП | |
|--------------------------|-----------|----------------|----------------|----------------|-----------------------------|--|
| | Мужчины | Женщины | Мужчины | Женщины | Мужчины | Женщины |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| У всех обследованных лиц | | | | | | |
| <i>M±m</i> | 5,88±0,82 | 18,13±1,95 | 12,25±1,51 | 26,76±4,86 | 25,17±6,51 | 47,12±2,97 |
| <i>Min–Max</i> | 0–26,98 | 0,65–101,00 | 0–10,45 | 0–102,46 | 5,08–27,59 | 3,12–146,62 |
| <i>n</i> | 43 | 73 | 56 | 25 | 15 | 94 |
| | | $P_2 < 0,0001$ | $P_2 = 0,0041$ | $P_4 = 0,0023$ | $P_2 < 0,0001$ | $P_6 = 0,0013$ $P_3 < 0,0001$ $P_5 = 0,0002$ |
| У лиц без ожирения | | | | | | |
| <i>M±m</i> | 5,75±0,87 | 16,53±2,0 | 7,67±1,32 | 20,92±4,02 | 16,62±7,65 | 36,62±4,60 |
| <i>Min–Max</i> | 0–26,98 | 0,65–101,64 | 0–41 | 0–76,56 | 5,08–31,09 | 14,05–87,04 |
| <i>n</i> | 40 | 65 | 36 | 19 | 3 | 20 |
| | | | | | $P_2 = 0,015$ $P_4 = 0,037$ | $P_3 < 0,0001$ |
| У лиц с ожирением | | | | | | |
| <i>M±m</i> | 7,71±1,48 | 31,09±5,85 | 20,51±2,64 | 45,27±14,05 | 28,31±7,89 | 49,79±3,5 |
| <i>Min–Max</i> | 4,84–9,76 | 14,32–63,11 | 1,53–44,11 | 1,23–102,46 | 5,26–83,45 | 3,12–146,62 |
| <i>n</i> | 3 | 8 | 20 | 6 | 12 | 74 |
| | | | | | | $P_3 = 0,036$ |

Примечание. То же, что в табл. 2.

Таблица 4

Содержание лептина (нг/мл) в сыворотке крови обследуемых мужчин и женщин при носительстве различных генотипов полиморфизма Gln223Arg в гене LEPR

| Показатели | Контроль | | АБП | | НАЖБП | |
|-----------------------|----------|-----------|----------------|-----------|-------------------------------|-------------------------------|
| | Мужчины | Женщины | Мужчины | Женщины | Мужчины | Женщины |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| У носителей Gln223Gln | | | | | | |
| <i>M±m</i> | 7,4±1,7 | 19,3±3,6 | 12,4±3,5 | 24,8±0,1 | 14,8±9,7 | 47,3±4,9 |
| <i>Min–Max</i> | 0–27,0 | 0,7–44,3 | 0–44,1 | 24,7–24,9 | 5,0–24,5 | 3,1–135,3 |
| <i>n</i> | 14 | 16 | 15 | 2 | 2 | 30 |
| | | | $P_2 = 0,0004$ | | | $P_3 = 0,0002$ |
| У носителей Gln223Arg | | | | | | |
| <i>M±m</i> | 6,1±1,4 | 19,5±3,8 | 8,8±1,8 | 22,6±5,5 | 35,8±9,5 | 54,8±5,7 |
| <i>Min–Max</i> | 0–20,5 | 0,7–101,6 | 0,5–35,0 | 1,2–76,6 | 5,3–83,5 | 9,3–146,6 |
| <i>n</i> | 16 | 30 | 23 | 14 | 8 | 33 |
| | | | | | $P_2 = 0,0003$ $P_4 = 0,0023$ | $P_3 < 0,0001$ $P_5 = 0,0009$ |
| У носителей Arg223Arg | | | | | | |
| <i>M±m</i> | 3,7±0,7 | 15,5±2,4 | 16,0±2,6 | 33,7±10,5 | 13,0±3,6 | 40,4±4,7 |
| <i>Min–Max</i> | 1,2–9,7 | 1,0–45,1 | 2,6–41,0 | 0–102,5 | 5,6–25,4 | 9,5–110,1 |
| <i>n</i> | 12 | 26 | 17 | 9 | 5 | 25 |
| | | | $P_2 = 0,0004$ | | $P_2 = 0,0023$ | $P_3 = 0,0004$ |

Примечание. То же, что в табл. 2.

Таблица 5
Распределение генотипов и аллельная частота полиморфизма Gln223Arg гена LEPR у обследуемых мужчин и женщин

| Генотипы, аллели | Показатели | Контроль | | | АБП | | | НАЖБП | | |
|------------------|------------|----------|---------|---------|------|---------|---------|-------|---------|---------|
| | | Все | Мужчины | Женщины | Все | Мужчины | Женщины | Все | Мужчины | Женщины |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
| Gln223 Gln | <i>n</i> | 117 | 47 | 70 | 81 | 56 | 25 | 109 | 18 | 91 |
| | % | — | 40 | 60 | — | 69 | 31 | — | 17 | 83 |
| | <i>n</i> | 32 | 18 | 14 | 17 | 15 | 2 | 34 | 2 | 32 |
| | <i>p</i> | 0,27 | 0,38 | 0,20 | 0,21 | 0,27 | 0,08 | 0,30 | 0,11 | 0,35 |
| Gln223Arg | <i>n</i> | 47 | 17 | 30 | 38 | 24 | 14 | 44 | 10 | 34 |
| | <i>p</i> | 0,42 | 0,36 | 0,43 | 0,47 | 0,43 | 0,56 | 0,41 | 0,56 | 0,37 |
| Arg223Arg | <i>n</i> | 38 | 12 | 26 | 26 | 17 | 9 | 31 | 6 | 25 |
| | <i>p</i> | 0,32 | 0,26 | 0,37 | 0,32 | 0,30 | 0,36 | 0,29 | 0,33 | 0,28 |
| 223Gln | <i>n</i> | 113 | 53 | 58 | 72 | 54 | 18 | 112 | 14 | 98 |
| | <i>p</i> | 0,48 | 0,56 | 0,41 | 0,44 | 0,48 | 0,36 | 0,5 | 0,39 | 0,54 |
| 223Arg | <i>n</i> | 123 | 41 | 82 | 90 | 58 | 32 | 106 | 22 | 84 |
| | <i>p</i> | 0,52 | 0,44 | 0,59 | 0,56 | 0,52 | 0,64 | 0,5 | 0,61 | 0,46 |

Примечание. *P* – достоверность различий данных в строках; *n* – количество обследованных лиц, *p* – частота встречаемости аллеля/генотипа.

В основной группе с НАЖБП статистически значимых различий в содержании лептина у носителей тестируемых генотипов не обнаружено. Тем не менее, у женщин – носителей генотипа Gln223Gln количество лептина было выше в 2,5 раза, чем у женщин контрольной группы с таким же генотипом. Среди носителей генотипа Gln223Arg содержание лептина у женщин с НАЖБП превышало таковое у женщин в контрольной группе в 2,8 раза и у женщин с АБП в 2,4 раза. Среди носителей Arg223Arg количество лептина у женщин с НАЖБП превышало таковое у женщин в контроле в 2,6 раза.

Таким образом, уровень лептина при носительстве аллеля 223Gln у лиц без патологии печени несколько выше, чем у носителей аллеля 223Arg. У пациентов с АБП и НАЖБП не обнаружено связи полиморфизма Gln223Arg с содержанием лептина в сыворотке крови.

5. Исследование связи полиморфизма Gln223Arg гена LEPR с НАЖБП

Результаты изучения распределения частот генотипов и аллелей полиморфного локуса гена LEPR Gln223Arg у обследованных лиц приведены в табл. 5. Согласно полученным данным, частота встречаемости мутантного варианта 223Arg несколько выше таковой для варианта 223Gln в группе контроля и в группе сравнения – соответственно 0,52 и 0,56 против 0,48 и 0,44, что соот-

ветствует популяционным данным (<http://www.genepassport.ru/base>). В основной группе вариант 223Arg встречался, наоборот, реже (49,5%), чем вариант 223Gln. Частота аллеля 223Gln у женщин с НАЖБП была выше, чем у женщин с АБП, в 1,5 раза (*отношение шансов* (ОШ) = 2,074, 95% *доверительный интервал* (ДИ) = 1,08–3,96, *p*=0,037) и выше, чем у женщин из группы контроля, в 1,3 раза (ОШ=1,649, 95%ДИ=1,06–2,57, *p*=0,033). Соответственно частота генотипа Gln223Gln у женщин с НАЖБП превышала соответствующие показатели для женщин с АБП в 1,5 раза (ОШ=6,24, 95%ДИ=1,38–28,18, *p*=0,0068) и для женщин из группы контроля в 1,3 раза (ОШ=2,17, 95%ДИ=1,05–4,49, *p*=0,037). При этом у мужчин с НАЖБП вариант 223Arg встречался чаще, чем у женщин с НАЖБП. Изложенное свидетельствует о связи носительства варианта 223Gln с развитием НАЖБП у женщин.

Лептин является ключевым гормоном регуляции массы тела. После открытия механизма действия лептина было предпринято немало попыток установить связь между ожирением и полиморфизмами генов лептина и его рецептора, в том числе полиморфизма Gln223Arg гена LEPR. Полученные результаты оказались неоднозначными [2, 11, 18], а участие тестируемого нами полиморфизма Gln223Arg в патогенезе НАЖБП не исследовано – соответствующие работы каса-

лись полиморфизмов в других локусах гена LEPR. Так, обнаружено, что частота нуклеотидной замены 3057 G→A (rs1805096) в гене LEPR значительно выше у пациентов с НАЖБП и инсулинорезистентностью 2-го типа, чем без НАЖБП [9]. Мутантные гомозиготы и гетерозиготы по LEPR генотипу и мутантный аллель гена LEPR (rs6700896) встречались чаще при стеатозе средней степени тяжести и при НАЖБП с диабетом по сравнению со стеатозом легкой степени тяжести и без диабета [16].

Наши исследования показали, что НАЖБП и АБП часто сопровождаются ожирением тела. Ожирение ассоциировано с повышением содержания лептина в сыворотке крови независимо от гепатостеатоза. Однако в группе НАЖБП уровень лептина в среднем был наиболее высок не только у мужчин и женщин с ожирением по сравнению с соответствующими лицами в других группах, но и у пациентов обоего пола без ожирения. При этом количество лептина в группе НАЖБП, как и у лиц с АБП, не зависело от полиморфизма Gln223Arg, что соответствует литературным данным [13]. Тем не менее, по нашим сведениям, в отличие от НАЖБП у лиц без патологии печени уровень лептина при носительстве аллеля 223Gln оказался выше, чем у носителей 223Arg.

Полученные результаты свидетельствуют, что полиморфизм Gln223Arg гена LEPR не связан с ожирением тела у лиц без патологии печени и при АБП, однако носительство аллеля 223Gln может предрасполагать к развитию НАЖБП и в отсутствие ожирения, особенно у женщин.

У обследуемых нами лиц НАЖБП сопровождалась наиболее высоким уровнем ХС в сыворотке крови по сравнению с лицами с АБП и без патоло-

гии печени. При этом данный показатель у пациентов с НАЖБП был выше, чем у обследуемых с АБП, за счет носителей генотипа Gln223Gln, что говорит о возможной связи носительства варианта 223Gln с нарушением жирового обмена. У женщин с НАЖБП вариант 223Gln (аллель 223Gln/генотип Gln223Gln) встречался чаще, чем вариант 223 Arg, по сравнению с другими группами.

Итак, установленная в наших исследованиях связь полиморфизма Gln223Arg в LEPR гене с НАЖБП заключается в том, что носительство варианта 223Gln может предрасполагать к повышению уровня холестерина в сыворотке крови и вести к увеличению риска развития болезни у женщин даже в отсутствие ожирения. Полученные результаты наиболее близки к сведениям S. Ben Ali и соавт [1], которые, исследуя связь полиморфизма Q223R в гене LEPR с ИМТ, плазменным лептином и параметрами липидов в популяции Туниса, показали, что среди лиц с ожирением у носителей варианта 223R ИМТ и уровень лептина ниже, чем у 223Q-носителей. Этим данным соответствуют результаты, полученные T. Furusawa и соавт., которые обнаружили, что носители 223Q аллеля гена LEPR имеют большую массу тела, более высокий ИМТ и больший риск ожирения, чем 223R гомозиготы [4].

Выводы

Носительство аллеля 223Gln полиморфизма Gln223Arg в гене LEPR предрасполагает к нарушениям жирового обмена, о чем свидетельствуют повышенные показатели холестерина и лептина в крови носителей, и к развитию НАЖБП в отсутствие ожирения, особенно у женщин.

Список литературы

1. Ben Ali S, Kallel A, Sediri Y, et al. LEPR p.Q223R Polymorphism influences plasma leptin levels and body mass index in Tunisian obese patients. Arch Med Res 2009; 40(3):186-90.
2. Chagnon YC, Wilmore JH, Borecki IB, et al. Associations between the Leptin Receptor Gene and Adiposity in Middle-Aged Caucasian Males from the HERITAGE Family Study. J Clin Endocrinol Metabol 2000; 85(1):29-34.
3. Constantin A, Costache G, Sima AV, et al. Leptin G-2548A and leptin receptor Q223R gene polymorphisms are not associated with obesity in Romanian. Biochem Biophys Res Commun 2010; 391(1):282-6.
4. Furusawa T, Naka I, Yamauchi T, et al. The Q223R polymorphism in LEPR is associated with obesity in Pacific Islanders. Hum Genet. 2010; 127(3):287-94.
5. Gavrilova O, Barr V, Marcus-Samuels B, Reitman M. Hyperleptinemia of pregnancy associated with the appearance of a circulating form of the leptin receptor. J Biol Chem 1997; 272(48):30546-51.
6. Guizar-Mendoza JM, Amador-Licona N, Flores-Martinez SE, et al. Association analysis of the Gln223Arg polymorphism in the human leptin receptor gene, and traits related to obesity in Mexican adolescents. J Hum Hypertens 2005; 19(5):341-6.
7. Lee G, Proenca R, Montez JM, et al. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. Nature 1996; 379:632-5.
8. Liu C, Liu X, Barry G, et al. Expression and characterization of a putative high affinity human soluble leptin receptor. Endocrinology 1997; 138:3548-54.
9. Lu H., Sun J, Sun L, et al. Polymorphism of human leptin receptor gene is associated with type 2 diabetic patients complicated with non-alcoholic fatty liver disease in China. J Gastroenterol Hepatol 2009; 2:228-32.
10. Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, et al. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. Nature 1997; 387:903-8.
11. Paracchini V, Pedotti P, Taioli E. Genetics of Leptin and Obesity: A HuGE Review. Am J Epidemiol 2005; 162(2):101-14.
12. Quinton ND, Lee AJ, Ross RJ, et al. A single nucleotide polymorphism SNP in the leptin receptor is associated with BMI, fat mass and leptin levels in postmenopausal Caucasian women. Human Genetics 2001; 108:233-6.
13. Roth MJ, Paltoo DN, Albert PS, et al. Common Leptin

- Receptor Polymorphisms do not Modify the Effect of Alcohol Ingestion on Serum Leptin Levels in a Controlled Feeding and Alcohol Ingestion Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers* 2005; 14:1576.
14. *Stefan N, Vozarova B, del Parigi A, et al.* The Gln223Arg polymorphism of the leptin receptor in Pima Indians: influence on energy expenditure, physical activity and lipid metabolism. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002; 26(12):1629-32.
 15. *Stratigopoulos G, LeDuc ChA, Matsuoka N, et al.* Functional consequences of the human leptin receptor (LEPR) Q223R transversion. *Obesity (Silver Spring)* 2009; 17(1):126-35.
 16. *Swellam M, Hamdy N.* Association of nonalcoholic fatty liver disease with a single nucleotide polymorphism on the gene encoding leptin receptor. *IUBMB Life* 2012; 64(2):180-6.
 17. *Woods AJ, Stock MJ.* Leptin activation in hypothalamus. *Nature* 1996; 81:745.
 18. *Yang GP, Peng SH, Zuo SY, et al.* Meta-analysis on the relationship between leptin receptor Gln223Arg and Pro1019Pro gene polymorphism and obesity in the Chinese population. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi* 2011; 32(10):1037-42.