

УДК 616.379-008.64(571.56)

ПОЛИМОРФИЗМ RS58542926 ГЕНА TM6SF2 ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ НЕИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЯХ ПЕЧЕНИ В ЯКУТСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ

Дьяконова А.Т., Куртанов Х.А., Павлова Н.И., Соловьева Н.А., Соловьева Ю.А., Филиппова Н.П., Александрова Т.Н.

ФГБНУ «Якутский научный центр комплексных медицинских проблем», Якутск, e-mail: dyakonovaa@bk.ru

Неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП) была самой частой патологией в структуре заболеваний печени в России: по данным на 2014 г., диагностирована в 25% случаев. Исследование полиморфизма rs58542926 гена *TM6SF2* было проведено в лаборатории наследственной патологии отдела молекулярной генетики Якутского научного центра комплексных медицинских проблем (ЯНЦ КМП). Всего было исследовано 142 образца ДНК якутов, из них 48 индивидов, имеющих в анамнезе хронические неинфекционные заболевания печени, и 94 здоровых добровольца. Однонуклеотидный полиморфизм (SNP) rs58542926 определяли с помощью ПЦР-ПДРФ метода. Анализ частоты аллелей полиморфизма rs58542926 гена *TM6SF2* установил, что группа больных, так же как и группа здоровых, характеризовалась преобладанием носителей аллеля С 62% и 88% соответственно. В группах больных и здоровых выявлено преобладание лиц с генотипом СС (54% и 82% соответственно). При этом генотип ТТ достоверно чаще встречался в группе лиц с хроническими неинфекционными заболеваниями печени (31%, $p \leq 0,005$). Значение OR (95% CI) для аллеля Т составило 5,257 (2,862-9,654), для гомозиготного генотипа ТТ 10,227 (3,165- 33,047).

Ключевые слова: полиморфизм, *TM6SF2*, НАЖБП, печень, липопротеиды очень низкой плотности.

POLYMORPHISM RS58542926 OF THE TM6SF2 GENE IN CHRONIC NON-INFECTIOUS LIVER DISEASES IN THE YAKUT POPULATION

Dyakonova A.T., Kurtanov Kh.A., Pavlova N.I., Soloveva N.A., Soloveva Yu.A., Filippova N.P., Aleksandrova T.N.

Federal State Budgetary Educational Institution "Yakut Scientific Center for Complex Medical Problems", Yakutsk, e-mail: dyakonovaa@bk.ru

Non-alcoholic fatty liver disease (according to 2014 data) was diagnosed in 25% of cases. The study of polymorphism rs58542926 of the *TM6SF2* gene was carried out in the laboratory of hereditary pathology of the department of molecular genetic studies (NSC KMP). A total of 142 DNA samples of Yakuts were studied, of which 48 individuals with a history of chronic non-infectious liver diseases and 94 healthy volunteers. Single nucleotide polymorphism (SNP) of rs58542926 is determined by PCR-RFLP. An analysis of the frequency of alleles of the rs58542926 polymorphism of the *TM6SF2* gene found that the group of patients also prevails in relation to carriers of the C allele 62% and 88%, respectively. In the groups of patients and healthy, a predominance of individuals with the SS genotype was revealed (54% and 82%, respectively). In this case, the TT genotype was significantly more likely to occur in the group of people with chronic non-infectious liver diseases (31%, $p \leq 0.005$). The OR value (95% CI) for the T allele was 5.257 (2.862-9.654), for the TT homozygous genotype 10.227 (3.165-33.047).

Keywords: polymorphism, *TM6SF2*, NAFLD, liver, very low density lipoproteins.

С каждым годом актуальность проблемы неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП) приобретает новое значение ввиду увеличения числа лиц с ожирением и метаболическим синдромом. В общемировой популяции, согласно результатам исследований, выполненных в период 1989–2015 гг., НАЖБП обнаруживается у 25% населения. По данным исследования Wong и соавт. (2013), распространенность НАЖБП в Азии составляет 15–30% среди общего населения и более 50% у пациентов с диабетом и метаболическим синдромом. В Шри-Ланке по данным Dassanayake и соавт. (2009), ее распространенность довольно высока и

составляет 33% в общей численности населения. В Индии, как отмечают Amagapurkar и соавт. (2007), распространенность НАЖБП составляет 9–32% в общей популяции и наиболее часто встречается среди пациентов с избыточным весом / ожирением и диабетом. В Корее, по оценкам исследователей, распространенность НАЖБП составляет от 25 до 30%, и этот показатель неуклонно растет из-за западных привычек питания, чрезмерного потребления пищи, изменений в образе жизни, увеличения численности пожилого населения и общего недостатка физических упражнений [1; 2]. Многие зарубежные исследователи обнаружили тесную связь НАЖБП с ожирением, инсулинорезистентностью (ИР) / сахарным диабетом 2 типа (СД2) и метаболическим синдромом. В своих исследованиях Bellentani и Tiribelli (2001) отмечают, что у индивидов с избыточным весом распространенность стеатоза в два раза чаще, чем у индивидов с низкой массой тела. Установлено, что при ожирении почти у всех пациентов присутствует стеатоз, и более чем треть людей с ожирением страдает неалкогольным стеатогепатитом (НАСГ) [1; 2].

Биологические механизмы НАЖБП, приводящие к внепеченочным заболеваниям, полностью не установлены. Тем не менее совокупные данные убедительно свидетельствуют о том, что периферическая резистентность к инсулину, дислипидемия и активация воспалительных путей, связанных с НАЖБП, имеют отношение к развитию внепеченочных заболеваний, в том числе к СД 2 типа. Некоторые исследования показали, что периферическая резистентность к инсулину и дислипидемия являются факторами риска развития желчнокаменной болезни [2].

В настоящее время, как наиболее распространенная причина хронических заболеваний печени, НАЖБП нуждается в ранней профилактике, такой как физические упражнения и изменение образа жизни, так как при ее отсутствии данная патология может привести к развитию стеатогепатита, фиброза печени, цирроза и гепатоцеллюлярной карциномы.

Исследованиями установлено, что пациенты, имеющие в анамнезе неалкогольный стеатогепатит, по сравнению с общей популяцией чаще демонстрируют смертность от печёночной недостаточности болезней. Важную роль в развитии НАЖБП играют генетические и экологические факторы. При этом НАЖБП была самой частой патологией в структуре заболеваний печени в России: по данным на 2014 г., диагностирована в 72% случаев. В числе пациентов с диагнозом НАЖБП у 77% наблюдался стеатоз печени, у 23% - неалкогольный стеатогепатит (НАСГ), у 3% диагностирован цирроз печени [3-5].

При помощи метода «ассоциативное тестирование всего генома» (GWAS) были проведены исследования, целью которых являлось определение значимости отдельных сайтов SNP, для которых предполагалась связь с НАЖБП и метаболизмом липидов. Результаты исследований продемонстрировали, что ключевую роль в развитии НАЖБП вне зависимости

от региона и этнической составляющей выполняют гены *PNPLA3*, *KLF6*, *GCKR*, *LYPLAL1*. На сегодняшний день SNP rs58542926 в локусе *TM6SF2* является одним из трех основных генов наряду с *PNPLA3* и *GCKR*, ассоциированных с НАЖБП. Первым доказанным геном, который ассоциируется с НАЖБП, является *PNPLA3*. Он влияет на уровень ферментов печени в плазме. Аллель G полиморфизма rs738409 гена *PNPLA3* сильно связана с НАЖБП, а также с увеличением показателей АСТ и АЛТ, уровня ферритина и стадии фиброза у пациентов с НАЖБП. *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 [6-8].

Вариант *TM6SF2* ассоциируется со стеатозом и фиброзом у пациентов с НАЖБП. Анализ пациентов с хроническим вирусным гепатитом С показал, что SNP rs58542926 усиливает фиброгенез печени и совместно с вирусным заболеванием может способствовать прогрессированию заболевания печени и атеросклероза [9]. Распространенность полиморфизма rs58542926 гена *TM6SF2* в мире представлена на рисунке 1.



Рис. 1. Частота встречаемости аллелей полиморфизма rs58542926 гена *TM6SF2* в различных популяциях, по данным Ensembl.org. Красным цветом обозначен аллель T, зеленым цветом обозначен аллель C

Полиморфизм rs58542926 представляет собой нуклеотидную замену гуанина на аденин в гене *TM6SF2*, что в свою очередь приводит к замене глутаминовой кислоты лизином в 167 (E167K) аминокислотном остатке.

На данный момент исследования полиморфизма rs58542926 гена *TM6SF2* в популяции якутов не проводились.

Цель исследования: анализ распространенности полиморфного варианта rs58542926 гена *TM6SF2* в якутской популяции.

Материалы и методы исследования

Исследование полиморфизма rs58542926 гена *TM6SF2* было проведено в лаборатории наследственной патологии отдела молекулярной генетики Якутского научного центра комплексных медицинских проблем (ЯНЦ КМП). Всего было исследовано 142 образца ДНК, 48 образцов ДНК индивидов, имеющих в анамнезе хронические неинфекционные заболевания печени, и 94 образца ДНК здоровых добровольцев. Информированное согласие на проведение генетического исследования было получено от каждого участника исследования. Все участники исследования по этнической принадлежности были якутами и проживали на территории РС (Я). Всем участникам исследования проведено комплексное клиничко-функциональное обследование в больнице ЯНЦ КМП.

Выделение ДНК из лимфоцитов периферической крови проводилось с помощью набора для выделения из цельной крови фирмы ООО «Excell Biotech» (г. Якутск, Россия). Однонуклеотидный полиморфизм определяли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ). Амплификация области гена, содержащего полиморфный вариант, проводилась стандартными парами праймеров производства «ООО Биотех-Индустрия» (г. Москва, Россия). Реакционная смесь для ПЦР содержала: праймер прямой и обратный по 10 пикомоль/мкл (1 мкл); Dream Taq PCR мастер микс - 12,5 мкл; деионизированной воды 9,5 мкл и ДНК в количестве 100 мкг/мл – 1 мкл. Общий объем реакционной смеси для амплификации составил 25 мкл. Смесь для ПДРФ объемом 20 мкл состояла из: амплификата - 7 мкл, деионизированной воды - 10,9 мкл, рестрикционного буфера - 2 мкл и эндонуклеазы рестрикции Hru188I (2 е.а.).

Температурно-временной режим для проведения ПЦР оптимизирован для амплификации данной нуклеотидной последовательности и представлен в таблице 1.

Таблица 1

Условия проведения ПЦР

Ген	Амплификат	Условия проведения ПЦР
<i>TM6SF2</i>	429 п.н.	1. 94 °С – 10 мин. 2. (94 °С – 1 мин.; 62 °С –

		40 сек.; 72 °С – 1 мин.) - 40 циклов 3. 72 °С – 10 мин.
--	--	---

Примечания: п.н. – пар нуклеотидов.

Детекция ПЦР продуктов проводилась с помощью горизонтального электрофореза в пластине 2% агарозного геля с добавлением бромистого этидия - специфического интеркалирующего флуоресцентного ДНК(РНК)-красителя - с использованием стандартного трис-ацетатного буфера при напряженности поля ~20 В/см в течение 30 минут.

Детекция ПДРФ продуктов проводилась с помощью горизонтального электрофореза в 4% агарозном геле окрашенным бромистым этидием с использованием стандартного трис-ацетатного буфера (1%) при 120 В в течение 1 часа (рис. 2).

Интерпретация результатов генотипирования была выполнена на основе различных шаблонов бэндов: *СС*-178, 166, 85 п. н.; *ТТ*-251, 178 п.н. и *СТ*- 251, 178, 166, 85 п.н., и представлена на рисунке 2.

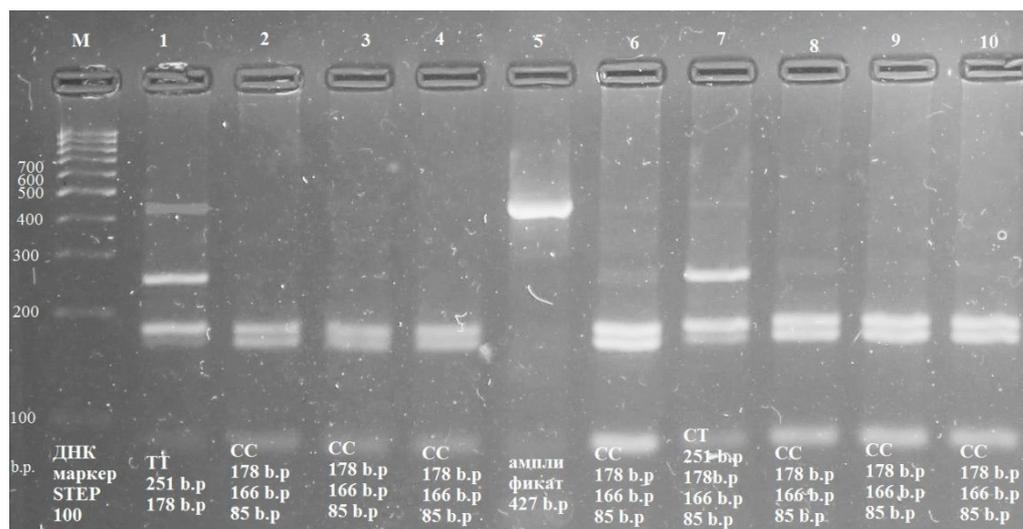


Рис. 2. Результаты электрофореза в 4% агарозном геле. М – маркер, с 1 по 10 лунки - расположены рестриктазы, в 5 лунке – амплификат

Примечание: b.p (base pairs) - пар нуклеотид.

Статистический анализ полученных результатов исследования был проведен с помощью программы Office Microsoft Excel 2010. Соответствие распределений генотипов ожидаемым значениям при равновесии Харди-Вайнберга и сравнение частот аллельных вариантов/генотипов проводили с использованием критерия χ^2 (хи-квадрата) методом Пирсона для таблиц сопряженности 2x2, расчетом отношения шансов (OR), 95% доверительного интервала (95% CI). Различия считались достоверными при $P < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Сравнительный анализ распределения аллелей полиморфизма rs58542926 гена *TM6SF2* установил, что группа больных, так же как и группа здоровых, характеризовалась преобладанием носителей аллеля *C* 62% и 88% соответственно (табл. 2).

Таблица 2

Распределение встречаемости генотипов и аллелей полиморфизма rs58542926 в группах больных и контрольной выборки

Генотипы, аллели	Больные (n = 48), (%)	Контрольная выборка (n=94), (%)	X ²	OR (95% CI)	Значимость, p
				для аллеля T	
<i>C/C</i>	54,17	81,91	20,691	5,257 (2,862-9,654)	0,000*
<i>C/T</i>	14,58	13,83			
<i>T/T</i>	31,25	4,26			
<i>C</i>	64,7	88,8	27,636		0,000**
<i>T</i>	35,3	11,2			

Примечание. Достигнутый уровень значимости при сравнении распределения генотипов (*) и частоты аллелей (**) в группах сравнения больных и контрольной выборки; n – численность выборок, X² с поправкой Йейтса.

Сравнительный анализ генотипов в группах больных и здоровых выявил преобладание лиц с генотипом *CC* (54% и 82% соответственно). При этом генотип *TT* достоверно чаще встречался в группе лиц с хроническими неинфекционными заболеваниями печени (31%, $p \leq 0,005$). Значение OR (95% CI) для аллеля *T* составило 5,257 (2,862-9,654), для гомозиготного генотипа *TT* 10,227 (3,165- 33,047).

Исследования Liu Y. и соавт. (2014) подтвердили ассоциацию между полиморфизмом rs58542926 гена *TM6SF2* и НАЖБП в мультиэтнических группах как у взрослых, так и детей [10]. Wang и соавт. [11] в исследовании 768 пациентов с диагнозом НАЖБП и здоровых индивидов китайской популяции установили, что, несмотря на свою низкую частоту, аллель *T* был достоверно связан с НАЖБП ($p < 0,001$). Аналогично в более раннем исследовании Wong и соавт. сообщили, что вариант аллеля *T* гена *TM6SF2* был обнаружен у четырех китайских индивидов из 920. Все четверо характеризовались повышенным содержанием печеночного жира, а у двух из них наблюдалась НАЖБП. Эти результаты были воспроизведены в когорте из 300 финских индивидов. Содержание жира в печени у анализируемых индивидов было значительно выше у носителей аллеля *T* по сравнению с носителями противоположного

аллеля. В исследовании 226 пациентов с гистологически подтвержденной НАЖБП в Аргентине Sookoian с коллегами обнаружили, что полиморфизм rs58542926 гена *TM6SF2* был тесно связан со степенью стеатоза печени, измеренной биопсией печени; и независимо от возраста, пола, индекса массы тела (ИМТ) и полиморфизма *PNPLA3* I148M [11]

В исследовании 1074 пациентов европейских национальностей с гистологически подтвержденным НАЖБП разной стадии Sookoian S. и соавт. (2015) обнаружили, что полиморфизм rs58542926 гена *TM6SF2* был достоверно ($p=0,037$) связан с повышенным риском выраженного стеатоза [12].

По данным исследования Liu Y.L. и соавт. (2014), носительство *T*-аллеля предрасполагает к НАЖБП, в то время как носительство *C*-аллеля способствует выведению липопротеидов очень низкой плотности (ЛПОНП) из печени, таким образом защищая печень за счет повышенного риска сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) [12]. Полученные результаты согласуются с данными других исследований. В исследованиях Kozlitina J. и соавт. (2014) была обнаружена значимость полиморфизма rs58542926 гена *TM6SF2* в развитии НАЖБП в трех независимых популяциях ($n>80000$). Авторы установили связь носительства аллеля *T* с более высоким циркулирующим уровнем аланиновой трансаминазы, маркера поражения печени и более низким содержанием липопротеидов низкой плотности (ЛПНП), триглицеридов и щелочной фосфатазы [13].

Заключение

Таким образом, в результате проведенного исследования установлено, что популяция якутов характеризуется преобладанием аллеля *C* rs58542926 гена *TM6SF2*. Среди лиц, имеющих в анамнезе хронические неинфекционные заболевания печени, преобладали носители генотипа *TT* rs58542926 гена *TM6SF2*, предрасполагающего к развитию неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП). Высокая частота носителей генотипа *TT*, вероятно, связана с недостаточным количеством исследуемых по выборке ($n=48$).

Исследование данного полиморфизма rs58542926 гена *TM6SF2* требует дальнейшего изучения на более крупных выборках популяций Якутии.

Список литературы

1. Kumar A., Walia G.K., Gupta V., Sachdeva M.P. Genetics of nonalcoholic fatty liver disease in Asian populations. *Journal of genetics*. 2019. V. 98. №. 1. С. 29.
2. Kim Y.K., Kwon O.S., Her K.H. The grade of nonalcoholic fatty liver disease is an independent risk factor for gallstone disease: An observational Study. *Medicine*. 2019. V. 98. №. 27. DOI: 10.1097/MD.00000000000016018.

3. Chung G.E., Lee Y., Yim J.Y., Choe E.K., Kwak M.S, Yang J.I., Park B., Lee J.E., Kim J.A., Kim J.S. Genetic polymorphisms of PNPLA3 and SAMM50 are associated with nonalcoholic fatty liver disease in a Korean population. *Gut and liver*. 2018. V. 12. №. 3. P. 316. DOI: 10.5009/gnl17306.
4. Богомолов П.О., Кокина К.Ю., Майоров А.Ю., Мишина Е.Е. Генетические аспекты неалкогольной жировой болезни печени // *Вопросы современной педиатрии*. 2018. №17(6). С 442-448 DOI: 10.15690/vsp.v17i6.1974.
5. Ивашкин В.Т., Драпкина О.М., Маев И.В. Распространенность неалкогольной жировой болезни печени у пациентов амбулаторно-поликлинической практики в Российской Федерации: результаты исследования DIREG 2 // *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2015. Т 25. № 6. С. 31–41. DOI: 10.21638/11701/spbu11.2017.201.
6. Bechmann L.P., Gastaldelli A., Vetter D., Patma, G. L., Pascoe L., Hannivoort R. A., Lee Y. M. Glucokinase links Kruppel-like factor 6 to the regulation of hepatic insulin sensitivity in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2012. №55(4). P.1083–1093. DOI: 10.1002/hep.24793.
7. Wang X., Liu Z., Wang K., Wang Z., Sun X., Zhong L., Deng G., Song G., Sun B., Peng Z., Liu W. Additive effects of the risk alleles of PNPLA3 and TM6SF2 on non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in a Chinese population. *Front Genet*. 2016. № 7. P.140. DOI: 10.3389/fgene.2016.00140.
8. Xu R., Tao A., Zhang S., Deng Y., Chen G. Association between patatin-like phospholipase domain containing 3 gene (PNPLA3) polymorphisms and nonalcoholic fatty liver disease: a HuGE review and meta-analysis. *Scientific reports*. 2015. № 5. P. 9284. DOI: 10.1038/srep09284.
9. Vespasiani-Gentilucci U., Dell'Unto C., De Vincentis A., Baiocchini A., Delle Monache M., Cecere R. Combining Genetic Variants to Improve Risk Prediction for NAFLD and Its Progression to Cirrhosis: A Proof of Concept Study. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2018. V. 2018. P.1-10. DOI: 10.1155/2018/7564835.
10. Chen L.Z., Xia H.H.X., Xin Y.N., Lin Z.H., Xuan S.Y. TM6SF2 E167K variant, a novel genetic susceptibility variant, contributing to nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of clinical and translational hepatology*. 2015. V. 3. №. 4. P. 265. DOI: 10.14218/JCTH.2015.00023.
11. Liu Y.L., Reeves H.L., Burt A.D., Tiniakos D., McPherson S., Leathart J.B., Allison M.E., Alexander G.J. TM6SF2 rs58542926 influences hepatic fibrosis progression in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Nature communications*. 2014. V. 5. P. 4309. DOI: 10.1038/ncomms5309.

12. Kozlitina J., Smagris E., Stender S., Nordestgaard B.G., Zhou H.H., Tybjærg-Hansen A., Cohen J. C. Exome-wide association study identifies a TM6SF2 variant that confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nature genetics*. 2014. №46(4). P.352. DOI: 10.1038/ng.2901.
13. Speliotes E.K., Yerges-Armstrong L.M., Wu J., Hernaez R., Kim L.J., Palmer C.D. Genome-wide association analysis identifies variants associated with nonalcoholic fatty liver disease that have distinct effects on metabolic traits. *PLoS genetics*. 2011.№7. P.e1001324. DOI: 10.1371/journal.pgen.1001324.