

М.Ю. ГОРШУНСКАЯ², Ю.И. КАРАЧЕНЦЕВ^{1,2},
Л.А. АТРАМЕНТОВА¹, Т.В. ТЫЖНЕНКО¹,
Н.А. КРАВЧУН¹, А.К. ПОЧЕРНЯЕВ¹, В.В. ПОЛТОРАК¹

¹ГУ «Институт проблем эндокринной патологии
им. В.Я. Данилевского АМН Украины», Харьков

²Харьковская медицинская академия последипломного образования
E-mail: atramentova@yandex.ru

ПОЛИМОРФИЗМ Q192R ГЕНА PON-1 У БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2-ГО ТИПА



По полиморфизму Q192R гена PON-1 генотипированы 96 больных сахарным диабетом 2-го типа и 123 здоровых жителя Харькова. Частоты аллелей у больных ($p_Q = 0,65$, $p_R = 0,35$) и здоровых ($p_Q = 0,70$ и $p_R = 0,30$) значительно не различаются. Распределение генотипов у здоровых людей не отличается от соотношения Харди-Вайнберга, у больных СД 2-го типа наблюдается избыток обеих гомозигот и недостаток гетерозигот. Риск заболевания СД 2-го типа для гомозиготы QQ в среднем в 1,47 раза выше, а для гетерозиготы QR в 2 раза ниже, чем в общем населении (2 %). Для гомозиготы RR отмечена статистически не значимая тенденция к повышению риска заболевания СД 2-го типа в 1,86 раза.

© М.Ю. ГОРШУНСКАЯ, Ю.И. КАРАЧЕНЦЕВ,
Л.А. АТРАМЕНТОВА, Т.В. ТЫЖНЕНКО, Н.А. КРАВЧУН,
А.К. ПОЧЕРНЯЕВ, В.В. ПОЛТОРАК, 2011

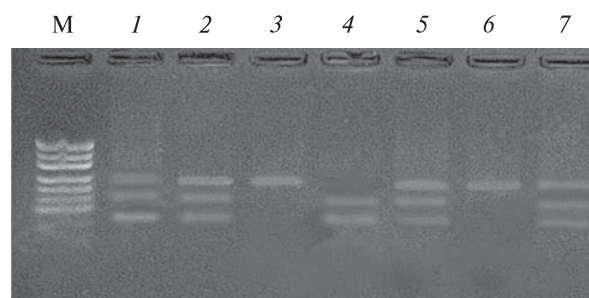
Введение. Ген *PON-1* человека, локализованный на длинном плече хромосомы 7 между q21.3 и q22.1 [1], контролирует фермент параоксоназу 1 (*PON-1*), проявляющую активность в отношении широкого спектра субстратов. *PON-1* синтезируется в печени и ассоциирована в основном с липопротеинами высокой плотности. *PON-1* участвует в детоксикации органофосфатов, предупреждает атерогенные модификации липопротеинов низкой и высокой плотности (ЛПНП и ЛПВП соответственно) [2, 3]. Авторы работ, демонстрирующих ассоциацию гена *PON-1* с сердечно-сосудистыми и эндокринными заболеваниями [4–6], отводят ему роль кандидатного гена атерогенной макрососудистой патологии [7–10], а аллельные варианты, снижающие экспрессию, предлагают использовать в качестве маркеров повышенного риска к этим заболеваниям [6, 11].

Однонуклеотидный полиморфизм гена *PON-1*, приводящий к изменению активности параоксоназы, представляет собой несинонимическую замену Q192R SNP в Region Ex6+78A > G [GenBank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>]. Эта замена связана с продукцией двух аллоферментов, различающихся аминокислотными остатками – глутаминовый (Q) или аргининовый (R) – в позиции 192 активного центра фермента [12].

Неоднозначность результатов работ, посвященных поиску генетических маркеров болезней с наследственным компонентом, в том числе и сахарного диабета, связана с тем, что в них обычно имеют в виду человека вообще, а не представителя определенной этнической группы, члена конкретной популяции, эволюционировавшей в уникальных климато-географических условиях. Таким образом, вопрос о наличии или отсутствии связи между аллельными вариантами гена и заболеваниями не предполагает однозначного ответа, а имеет конкретно-популяционное содержание. Поэтому целью настоящего исследования было сравнить распределение однонуклеотидного полиморфизма гена *PON-1*, определяющего аминокислотную замену 192Q → R параоксоназы, у больных сахарным диабетом 2-го типа и здоровых людей населения города Харькова и Харьковской области.

Материалы и методы. Образцы крови 96 (28 мужчин и 68 женщин) больных СД 2-го типа с признаками метаболического синдрома полу-

ченны в клинике Института проблем эндокринной патологии им. В.Я. Данилевского АМН Украины, 123 (86 мужчин и 37 женщин) здоровых доноров – на Харьковской областной станции службы крови с их письменного согласия. ДНК выделена из лейкоцитов при помощи ионообменной смолы Челекс-100 (Chelex-100) [13]. Однонуклеотидную замену, которая ведет к изменению в аминокислотной последовательности параоксоназы в позиции 192 с глутамина на аргинин, определяли путем амплификации в полимеразной цепной реакции фрагмента гена размером 199 пар нуклеотидов с последующим гидролизом эндонуклеазой *BspPI*. Были использованы прямой (PON192F TATGTGTC-TGTGGGACCTGAG) и обратный (PON192R GACATACTTGCCATCGGGTGAA) праймеры [14]. В качестве маркера молекулярной массы была использована ДНК *pUC19*, гидролизованная эндонуклеазой *MspI*. Разделение фрагментов ДНК после рестрикции осуществляли с помощью электрофореза в 2%-ном агарозном геле. Электрофореграмма ПЦР-продуктов (рисунок) дает представление о генотипах по гену *PON-1*. Одна полоска, соответствующая фрагменту ДНК размером 199 пар нуклеотидов, в образцах 3 и 6 указывает на генотип *QQ*. В образце 4 (генотип *RR*) две полоски представляют фрагменты ДНК длиной 135 и 64 пар нуклеотидов. Три полоски (199, 135 и 64 пары нуклео-



Q/R Q/R Q/Q R/R Q/R Q/Q Q/R

Электрофореграмма продуктов ПЦР специфической последовательности ДНК, генотипированной по SNP-полиморфизму гена *PON-1* в Region Ex6 + 78A > G. М – маркер молекулярной массы ДНК *pUC19*, гидролизованной эндонуклеазой *MspI*. Длина рестрицированных фрагментов ДНК – 501; 489; 404; 331; 242; 190; 147; 111; 110; 67; 34; 26 пар нуклеотидов (подчеркнуты фрагменты, которые не видны в агарозном геле); 1–7 – ДНК больных с различными генотипами

тидов) в образцах 1, 2, 5 и 7 свидетельствуют о генотипе *QR*.

Как было показано ранее [15], частоты аллелей гена *PON-1* значимо не различаются у мужчин и женщин, а также у русских и украинцев, поэтому в настоящей работе результаты генотипирования представлены без учета этнической и половой принадлежности обследуемых. Статистические гипотезы о равенстве фактических, а также фактических и теорети-

Характеристики распределения аллелей и генотипов у больных сахарным диабетом и здоровых людей

Группа	Показатель	Генотипы				Частоты аллелей	n/n*
		QQ	QR	RR	Всего		
Здоровые	n	48	64	11	123	$p_Q = 0,65, df = 2; \chi^2_{st} = 3,84; \chi^2 = p_R = 0,35 = 2,51; p > 0,05$	
	n*	52	56	15	123		
	%	39,0 ± 4,4	52,0 ± 4,5	9,0 ± 2,6	100		
	%*	42,3	45,4	12,3	100		
Больные сахарным диабетом 2-го типа	n	55	25	16	96	$p_Q = 0,70, df = 2; \chi^2_{st} = 3,84; \chi^2 = p_R = 0,30 = 12,44; p < 0,001$	
	n*	47	40	9	96		
	%	57,3 ± 5,1	26,0 ± 4,5	16,7 ± 3,8	100		
	%*	49,0	42,0	9,0	100		
Относительный риск		1,47 ± 0,21	0,50 ± 0,10	1,86 ± 0,69			
95 % ДИ показателя ОР		1,06 ÷ 1,88	0,31 ÷ 0,69	0,49 ÷ 3,23			

Примечание. n – количество обследованных, n* – теоретически ожидаемое количество при условии равновесия популяции, % – фактическая доля в процентах, %* – теоретическая доля в процентах, ДИ – доверительный интервал, df – число степеней свободы; ОР – относительный риск, χ^2_{st} – пороговое значение критерия, χ^2 – фактическое значение критерия, p – уровень значимости.

ческих рядов оценивали с помощью критерия χ^2 на уровне значимости $p \leq 0,05$. Относительный риск и доверительный интервал рассчитаны по [16], ошибка выборочности для показателя относительного риска – по [17].

Результаты исследований и их обсуждение. Частоты аллелей значимо не различаются у больных ($p_Q = 0,65$, $p_R = 0,35$) и здоровых людей ($p_Q = 0,70$ и $p_R = 0,30$, таблица). Соотношение генотипов в контрольной группе описывается уравнением Харди-Вайнберга. В группе больных сахарным диабетом 2-го типа распределение генотипов свидетельствует об отклонении от панмиксного состояния ($p < 0,001$). Это проявляется в недостатке гетерозигот (50 % по отношению к контрольной группе здоровых людей, $p < 0,001$) и избытке обеих гомозигот. При этом доля генотипов *QQ* на 47 % выше контрольного значения ($p < 0,05$), а удельный вес генотипов *RR* хотя и сильнее превышает этот показатель в контрольной группе (на 86 %), из-за небольшого числа наблюдений статистически не значим ($p > 0,05$). Оценка относительного риска показала, что для гомозиготы *QQ* вероятность заболеть сахарным диабетом 2-го типа в 1,47 раза превышает средний популяционный риск, который для изученного населения составляет около 2 %. Для генотипа *RR* отмечено более высокое, но статистически не значимое повышение риска развития сахарного диабета 2-го типа (в 1,86 раза, $p > 0,05$), поэтому до получения большего числа наблюдений можно говорить лишь о тенденции. У обладателей генотипа *QR* риск заболевания сахарным диабетом 2-го типа в два раза меньше ($p < 0,05$), чем в среднем в популяции. Все это позволяет считать, что изученный локус по отношению к признаку «подверженность заболеванию сахарным диабетом 2-го типа» обладает эффектом сверхдоминирования. Повышенную устойчивость к заболеваниям гетерозигот объясняют 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 ЛПВП максимальна у индивидов с генотипом *PON-1 192RR*, а у индивидов с генотипом *PON-1 192QQ* эта активность в несколько раз ниже

[18]. Вместе с тем способность аллоферментов параоксоназы защищать ЛПНП от окисления полностью противоположна параоксонгидролизующей активности. Так, *PON-1 192R* намного слабее защищала ЛПНП от перекисидации, чем *PON-1 192Q*, что говорит о меньшей активности аллофермента *PON-1 R* при метаболизировании липидных перекисей по сравнению с аллоферментом *PON-1 Q*. Гетерозигота, таким образом, обладает более надежной защитой от комбинированного воздействия неблагоприятных факторов внешней и внутренней среды, большей адаптивностью, чем каждая из гомозигот. В свете этой информации становится понятно, почему гетерозиготы проявляют повышенную устойчивость к заболеванию.

M. Gorshunskaya, Y. Karachentsev, L. Atramentova, T. Tyzhnenko, N. Kravchun, A. Pochernyaev, V. Poltorak

Q192R POLYMORPHISM OF *PON-1* GENE IN TYPE 2 DIABETIC PATIENTS

Polymorphism of *PON-1* gene in 192 position of amino acid sequence of enzyme paraoxonase 1 was studied. For this research we have used the blood samples of 96 patients with T2DM and 123 healthy habitants of Kharkiv. Frequencies of alleles for the patients ($p_Q = 0,65$, $p_R = 0,35$) and the healthies ($p_Q = 0,70$ and $p_R = 0,30$) did not differentiate meaningfully. Distribution of the genotypes for healthy people does not correspond to Hardy-Weinberg equilibrium, the patients of T2DM have surplus of both homozygotes and shortage of heterozygotes. The risk of illness of T2DM for *QQ* homozygotes is 1,46-times higher and for *QR* heterozygotes is two times lower than on the average in the population (2 %). The risk of illness of T2DM for *RR* homozygotes 1,86-times exceeds a middle population risk but is not significant.

М.Ю. Горшунська, Ю.І. Караченцев, Л.А. Атраментова, Т.В. Тижненко, Н.А. Кравчун, А.К. Почерняєв, В.В. Полторак

ПОЛІМОРФІЗМ *Q192R* ГЕНА *PON-1* У ХВОРИХ НА ЦУКРОВИЙ ДІАБЕТ 2-ГО ТИПУ

За поліморфізмом *Q192R* гена *PON-1* генотиповані 96 хворих на цукровий діабет 2-го типу і 123 здорових мешканців м. Харкова. Частоти алелів у хворих ($p_Q = 0,65$, $p_R = 0,35$) і здорових ($p_Q = 0,70$ і $p_R = 0,30$) значущо не відрізняються. Розподіл генотипів у здорових людей не відхиляється від співвідношення Харді-Вайнберга, у хворих на цукровий діабет 2-го типу спостерігається надлишок обох гомозигот і недостача гетерозигот. Ризик захворювання для гомозиготи *QQ* в се-

редньому в 1,47 разу вище, а для гетерозиготи QR в два рази нижче, ніж в загальному населенні (2%). Для гомозиготи RR зазначено статистично не значущу тенденцію до підвищення ризику захворювання на цукровий діабет 2-го типу у 1,86 разу.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Clendenning J.B., Humbert R., Green E.D. et al. Structural organisation of the human PON1 gene // *Genomics*. – 1996. – **35**. – P. 586–589.
2. Mackness M.I., Arrol S., Abbot C., Durrington P.N. Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase // *Atherosclerosis*. – 1993. – **104**. – P. 129–135.
3. Draganov D.I., La Du B.N. Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review // *Naunyn Schmiedelberg Arch. Pharmacol.* – 2004. – **369**. – P. 78–88.
4. Antikainen M., Murtomaki S., Syvanne M. et al. The Gln-Arg 191 polymorphism of the human paraoxonase gene (HUMPONA) is not associated with the risk of coronary artery disease in Finns // *J. Clin. Invest.* – 1996. – **98**. – P. 883–885.
5. Huang Q., Lui Y.H., Yang Q.D. et al. Human serum paraoxonase gene polymorphism, Q192R and L55M, are not associated with the risk of cerebral infarction in Chinese Han population // *Neurol. Res.* – 2006. – **28**(5). – P. 549–554.
6. Sanghera D.K., Saha N., Aston C.E., Kamboh M.I. Genetic polymorphism of paraoxonase and the risk of coronary heart disease // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 1997. – **17**(6). – P. 1067–1073.
7. Aviram M., Bilecke S., Sorenson R. et al. Paraoxonase active site required for protection against LDL oxidation involves its free sulfhydryl group and is different from that required for its arylesterase/paraoxonase activities: selective action of human paraoxonase allozymes Q and R // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 1998. – **18**. – P. 1617–1624.
8. Imai Y., Morita H., Kurihara H. et al. Evidence for association between paraoxonase gene polymorphisms and atherosclerotic diseases // *Atherosclerosis*. – 2000. – **149**. – P. 435–442.
9. Voetsch B., Kelly M., Benke S. et al. Paraoxonase 192 Gln-Arg polymorphism an independent risk factor for nonfatal arterial ischemic stroke among young adults // *Stroke*. – 2002. – **33**. – P. 1459–1464.
10. Odowara M., Tachi Y., Yamashita K. Paraoxonase polymorphism (Gln 192-Arg) is associated with coronary heart disease in Japanese noninsulin-dependent diabetes mellitus // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 1997. – **82**. – P. 2257–2260.
11. Kotur-Stevuljevic J., Spasic S., Stefanovic A. et al. Paraoxonase-1 (PON1) activity, but not PON1 (Q192R) phenotype, is a predictor of coronary artery disease in a middle-ages Serbian population // *Clin. Chem. Lab. Med.* – 2006. – **44**(10). – P. 1206–1213.
12. Zhang B., Eto S., Fan P. et al. Paraoxonase (Pon1) Q192R polymorphism and serum PON1 activity in diabetic patients on maintenance hemodialysis // *Clin. Nephrol.* – 2003. – **60**(4). – P. 257–265.
13. Walsh P.S., Metzger D.A., Higuchi R. Chelex 100 as a medium for extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material // *BioTechniques*. – 1991. – № 10. – P. 506–513.
14. Ombres D., Pannitteri G., Montali A. et al. Gln-Arg192 polymorphism of human paraoxonase gene is not associated with coronary artery disease in Italian patients // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 1998. – **18**. – P. 1611–1616.
15. Почерняев А.К., Тыжненко Т.В., Горшунская М.Ю., Полторак В.В., Атраментова Л.А. Полиморфизм гена параоксоназы (PON-1) у славянской части населения Харькова // *Цитология и генетика*. – 2009. – **43**, № 5. – С. 64–68.
16. Armitage P., Berry G. *Statistical methods in medical research*. – Oxford: Blackwell Sci. Publ., 1994. – 620 p.
17. Плохинский Н.А. *Биометрия*. – М.: Изд-во Моск. ун-та., 1970. – 368 с.
18. Durrington P.N., Mackness B., Mackness M.I. Paraoxonase and atherosclerosis // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2001. – **21**. – P. 473.

Поступила 03.08.09