

УДК 575:599.9

АНАЛИЗ АССОЦИАЦИЙ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ *LEPR* (rs1137100), *LRP5* (rs3736228) И *LPL* (rs320) С РИСКОМ РАЗВИТИЯ САХАРНОГО ДИАБЕТА 2-го ТИПА

© 2019 г. О. В. Кочетова^{1, *}, Д. Ш. Авзалетдинова², Л. Ф. Шарипова², Г. Ф. Корыгина¹, Л. З. Ахмадишина¹, Т. В. Моругова², О. Е. Мустафина¹

¹Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, 450054 Россия

²Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, 450000 Россия

*e-mail: Olga_mk78@mail.ru

Поступила в редакцию 17.04.2018 г.

После доработки 25.05.2018 г.

Принята к публикации 14.06.2018 г.

Сахарный диабет 2-го типа – многофакторное заболевание с наследственной предрасположенностью. Однако генетические механизмы его развития до конца не выяснены. Нами был проведен поиск ассоциаций полиморфных вариантов вовлеченных в развитие ожирения генов *LEPR* (rs1137100), *LRP5* (rs3736228) и *LPL* (rs320) с сахарным диабетом 2-го типа. Ассоциация с развитием заболевания была установлена для аллеля *T* локуса *LRP5* (rs3736228) ($p = 0.029$, OR = 1.46). Выявлена ассоциация локуса rs1137100 гена *LEPR* ($p = 0.032$) с уровнем индекса массы тела (ИМТ), не связанная с наличием сахарного диабета 2-го типа. Маркерами риска развития диабета 2-го типа являются аллель *T* локуса rs3736228 гена *LRP5* (OR = 1.74, $p = 0.012$) и аллель *G* локуса rs320 гена *LPL* (OR = 1.39, $p = 0.027$), статистически значимая ассоциация выявлена только в группе пациентов без ожирения. У индивидов с генотипом *TT* локуса *LPL* rs320 наблюдалось снижение уровня липопротеинов низкой плотности ($p = 0.04$), а лица с генотипами *GT* и *GG* этого локуса имели пониженный уровень холестерина ($p = 0.027$). У носителей генотипа *CC* локуса *LRP5* rs3736228 было выявлено снижение уровня ИМТ ($p = 0.012$) и снижение концентрации триглицеридов в крови ($p = 0.00000004$).

Ключевые слова: сахарный диабет 2, липопротеинлипаза, рецептор лептина, ген Wnt-сигналинга, полиморфный маркер.

DOI: 10.1134/S0016675819040052

В последние годы практически во всех странах мира отмечается рост заболеваемости сахарным диабетом 2-го типа (СД2). Согласно оценке экспертов Всемирной Организации Здравоохранения, в настоящий момент в мире насчитывается 180 млн больных СД2, и прогнозируется, что к 2025 г. их количество достигнет 330 млн человек. В России также отмечается рост этой патологии. Широкая распространенность, ранняя инвалидизация пациентов, высокая смертность от осложнений обуславливают актуальность исследований [1]. Считается, что ожирение приводит к формированию СД2. В последние годы молекулярно-генетические механизмы этиопатогенеза СД2 являются объектом широкомасштабных исследований во всем мире [2].

Проведенные ген-кандидатные анализы выявили ряд генов, ассоциированных с СД2 и количественными параметрами, определяющими диабет 2-го типа. Один из таких генов – ген *LEPR*,

кодирующий рецепторы лептина. Лептин – гормон, вырабатываемый адипоцитами и рядом других тканей, таких как слизистая оболочка желудка, действует как сигнальная молекула, участвующая в регуляции массы тела. Достигая мозга, лептин влияет на гипоталамические рецепторы, приводя к уменьшению аппетита, стимулируя потребление энергии и потерю массы тела [3]. Лептин выполняет свою функцию путем связывания с его рецепторами, принадлежащими к семейству цитокиновых [4]. Эти рецепторы расположены главным образом в гипоталамусе, также они обнаруживаются в тканях и клетках, которые регулируют гомеостаз глюкозы, например в бета-клетках поджелудочной железы. В этом случае рецепторы лептина влияют на ингибирование секреции инсулина, опосредованное лептином. Данные факты делают очевидным связь гена *LEPR* как гена-кандидата с риском развития СД2 [5].

Ген *LRP5* кодирует протеин, относящийся к рецепторам липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), а также являющийся рецептором Wnt-сигнального пути. *LRP5* отвечает за рост и развитие клеток и считается ключевым регулятором развития тканей и гомеостаза. Кроме того, известно, что сигнальный путь Wnt играет ключевую роль в регуляции β -клеточной функции поджелудочной железы [6]. Гену *LRP5* уделяют большое внимание при исследовании остеопороза, однако рядом исследователей была показана роль этого гена в развитии предрасположенности к СД2. Установлено, что Wnt/*LRP5*-сигнальный путь является связующим звеном между адипогенезом и остеогенезом [7]. Исследования, проводимые на модельных животных, показали, что *LRP5* влияет на метаболизм холестерина и глюкозы. Показано, что полиморфные варианты этого гена ассоциированы с риском развития ожирения и дислипидемии [7]. Ожирение, в свою очередь, связано с развитием инсулинрезистентности и вовлечено в патогенез СД2. Исследования по данному гену при СД2 малочисленны.

Липопротеинлипаза (LPL) является ключевым ферментом метаболизма липидов человека. LPL расщепляет триглицериды самых крупных по размеру и богатых липидами липопротеинов плазмы крови – хиломикрон и липопротеинов очень низкой плотности – в свободные жирные кислоты и моноацилглицерин [8]. Дефицит LPL приводит к развитию атеросклероза, ожирения, дислипидемии, инсулиновой резистентности и СД2. При СД2 активность LPL обычно недостаточна и способствует увеличению уровня триглицеридов в сыворотке крови. Различные полиморфные варианты, обнаруженные в гене *LPL*, уменьшают или увеличивают активность фермента, тем самым изменяя уровень холестерина и липопротеинов. Известно, что полиморфный локус rs320 гена *LPL* связан с уровнями триглицеридов и липопротеинов высокой плотности и концентрацией общего холестерина в плазме крови [9]. Показана взаимосвязь полиморфных вариантов гена *LPL* с инсулинрезистентностью [10].

Таким образом, по результатам анализа литературных данных была установлена возможная ассоциация полиморфных вариантов генов *LEPR* (rs1137100), *LRP5* (rs3736228) и *LPL* (rs320) с риском развития ожирения и количественными параметрами, характеризующими СД2 [7, 10]. Вместе с тем результаты, полученные исследователями на различных популяциях, весьма противоречивы. Это может быть вызвано различием в специфике распределения частот генотипов и аллелей в популяции мира. В свое исследование мы включили испытуемых татарской этнической принадлежности, проживающих в Республике Башкортостан. Ранее проведенные исследования по изучению генофонда популяции татар показали, что у них в

70% случаев встречаются гаплогруппы, характерные для народов Западной Евразии. На долю же восточного компонента приходится около 30–20% гаплогрупп [11].

Цель настоящего исследования заключалась в выявлении ассоциации полиморфных вариантов гена рецептора лептина *LEPR* (rs1137100), гена *LRP5* (rs3736228) и гена липопротеинлипазы *LPL* (rs320) с развитием сахарного диабета 2-го типа в популяции татар.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании были использованы образцы ДНК 930 неродственных индивидов, татар по этнической принадлежности, проживающих на территории Республики Башкортостан. Из них 486 пациентов с СД2 и 444 – без клинических и лабораторных признаков диабета. Описание выборок приведено в табл. 1.

Исследование было одобрено Комитетом по этике ИБГ УНЦ РАН. От всех участников исследования получали информированное добровольное согласие на использование биологического материала.

Генотипирование. ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови с использованием фенольно-хлороформной очистки. Исследовали полиморфные локусы генов *LEPR* (rs1137100), *LRP5* (rs3736228) и *LPL* (rs320) при помощи ПЦР с последующим расщеплением продукта соответствующими рестриктазами *Hae*III, *Dra*III, *Hind*III. Условия проведения ПЦР, последовательности праймеров представлены в табл. 2.

Результаты амплификации и рестрикции оценивали при помощи вертикального электрофореза в 6–8%-ном полиакриламидном геле. Гель окрашивали раствором бромистого этидия (0.1 мкг/мл) в течение 15 мин и фотографировали в проходящем ультрафиолетовом свете. Для определения размеров продукта использовали маркер молекулярной массы с шагом 100 пн (СибЭнзим, Россия).

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку данных проводили, используя пакеты прикладных программ Statistica v. 6.0 (StatSoft Inc., USA) и PLINK v. 1.07 [12]. Ассоциацию между полиморфными вариантами исследуемых генов и ожирением оценивали с использованием критерия χ^2 -Пирсона. Сравнивали попарно группы пациентов СД2 и индивиды контрольной группы. Рассчитывали частоты аллелей и генотипов, соответствие распределения частот генотипов равновесию Харди–Вайнберга (χ^2 и *p*). Логистическую регрессию использовали для выявления ассоциации полиморфных вариантов изученных генов с развитием СД2; экспоненту отдельного коэффициента регрессии (*beta*) интерпретировали

Таблица 1. Характеристика обследованных выборок

Показатель	Контроль	Пациенты СД2
<i>N</i>	<i>N</i> = 444	<i>N</i> = 486
Мужчины, % (<i>N</i>)	40.5 (180)	32.6 (158)
Женщины, % (<i>N</i>)	59.5 (262)	67.4 (328)
Возраст, лет	56.3	60.9
Вес, кг	78.9	80.4
Рост, см	173.2	161.6
ИМТ, кг/м ²	25.4	30.9
Систолическое давление, мм. рт. ст.	120.4	142.6
Диастолическое давление, мм. рт. ст.	80.2 ± 7.8	105.1 ± 11.6
Глюкоза крови натощак, ммоль/л	4.9 ± 0.8	7.1 ± 1.9
Холестерин, ммоль/л	5.01 ± 9.6	5.44 ± 1.13
Триглицериды, ммоль/л	1.4 ± 0.5	1.7 ± 1.3
Липопротеины высокой плотности (ЛПВП), ммоль/л	2.9 ± 1.01	3.1 ± 1.4
Липопротеины низкой плотности (ЛПНП), ммоль/л	1.08 ± 0.3	1.2 ± 0.5
HbA1c, %	4.8 ± 0.6	6.7 ± 1.3
С-пептид, нг/мл	2.26 ± 0.9	2.3 ± 1.2

Таблица 2. Полиморфные маркеры, вошедшие в исследование, их локализация, нуклеотидные последовательности праймеров, рестриктазы и аллели

Ген	Полиморфизм, локализация	Праймеры, рестриктаза	Аллель, размеры фрагментов, пн
<i>LEPR</i>	c.326A>G rs1137100 Lys109Arg Экзон 2	F: 5'-TTTCCACTGTTGCTTTTCGGA-3' R: 5'-AAACTAAAGAATTTACTGTTGAAACAAATGGC-3' <i>Hae</i> III	A – 100, G – 70, 30
<i>LRP5</i>	c.2246C>T rs3736228 p.Ala749Val Экзон 18	F: 5'-GACTGTCAGGACCGCTCACACG-3' R: 5'-AAGGTTTTTCAGAGCCCCTAC-3' <i>Dra</i> III	C – 143, T – 119
<i>LPL</i>	g.27496T>G Инtron 8	F: 5'-AGATGCTACCTGGATAATCAAAG-3' R: 5'-AATTTGTCAATCCTAACTTAGAG-3' <i>Hind</i> III	T – 139, 90, G – 229

ли как отношение шансов (OR) с расчетом 95%-ного доверительного интервала.

Вклад аллельных вариантов изучаемых генов-кандидатов в вариабельность количественных клинико-биохимических показателей (уровень глюкозы, липидов и т.д.) определяли с помощью критерия Крускала–Уоллиса (в случае трех групп) или Манна–Уитни (в случае двух групп), расчеты проводили по программе Statistica v. 6.0 (StatSoft Inc., USA) [13].

РЕЗУЛЬТАТЫ

На первом этапе работы мы проверили соответствие распределения частот генотипов полиморфных локусов равновесию Харди–Вайнберга, а также оценили частоты редкого аллеля (minor allele frequency, MAF) в выборках больных и в контроле. Получены следующие результаты при изучении группы контроля: *LEPR* (rs1137100) ($p = 0.82$, MAF = 0.306), *LRP5* (rs3736228) ($p = 0.34$, MAF = 0.081), *LPL* (rs320) ($p = 0.89$, MAF = 0.226).

Таблица 3. Распределение частот полиморфных вариантов генов *LRP5*, *LEPR*, *LPL* в группе больных СД2 и контрольной группе

Ген, полиморфизм	Генотипы, аллели	Хромосома	СД2 (N = 486) %/N	Контроль (N = 444) %/N	<i>p</i> (χ^2 для генотипов)	<i>p</i> (χ^2 для аллелей)
<i>LRP5</i> , rs3736228 с.2246C>T р.Аla749Val	CC	11:68433827	78.40/381	84.01/373	0.06	0.029
	CT		20.78/101	15.7/770		
	TT		0.82/4	0.23/1		
	C		88.79/863	91.89/816		
	T		11.21/109	8.11/72		
<i>LEPR</i> , rs1137100 с.326A>G р.Lys109Arg	AA	1:65570758	44.44/216	47.75/212	0.13	0.88
	AG		48.97/238	43.24/192		
	GG		6.58/32	9.01/40		
	G		68.93/670	69.37/616		
	A		31.07/302	30.63/272		
<i>LPL</i> , rs320 g.27496T>G	TT	8:19961566	54.32/264	59.68/265	0.12	0.051
	GT		38.07/185	35.36/157		
	GG		7.61/37	4.95/22		
	T		73.35/713	77.36/687		
	G		26.65/259	22.64/201		

Полученное распределение частот соответствует частоте редкого аллеля в популяции НаpМар-CEU (MAF = 0.338, MAF = 0.138, MAF = 0.270 соответственно).

В табл. 3 представлены данные по распределению частот генотипов и аллелей изученных локусов, значимость различий между группами больных СД2, а также показатели отношения шансов, рассчитанные для редкого аллеля каждого локуса. Статистически значимые различия между исследованными группами выявлены при анализе полиморфного локуса rs3736228 гена *LRP5* среди больных СД2 ($p = 0.029$).

В табл. 4 представлены статистически значимые результаты анализа ассоциации с развитием СД2 (с определением коэффициента регрессии, β , экспоненту которого интерпретировали как OR для логистической модели с расчетом 95%-ного доверительного интервала – 95% CI) и результаты анализа уровня значимости с учетом возраста и индекса массы тела (ИМТ) в различных моделях.

Обнаружена ассоциация редкого аллеля T локуса *LRP5* (rs3736228) с развитием СД2 ($p = 0.029$, OR = 1.46). В данном случае аддитивная модель более информативна ($p = 0.02$, OR = 1.43). Она показывает, что каждая доза редкого аллеля T увеличивает риск заболевания.

На уровне тенденции выявлена ассоциация локуса *LPL* (rs320) за счет увеличения частоты редкого аллеля G в группе больных до 26.65% по сравнению с 22.64% в контрольной группе ($p = 0.051$, OR = 1.24). Более информативной является аддитивная модель ($p = 0.046$, OR = 1.24),

свидетельствующая, что каждая доза редкого аллеля G увеличивает риск заболевания.

Анализ влияния уровня ИМТ и гендерных различий при развитии СД2

При анализе выбранных генов взаимосвязь между уровнем ИМТ и заболеванием СД2 показано только для локуса *LEPR* (rs1137100) ($p = 0.032$). Показано, что этот локус статистически значимую ассоциацию имеет только с уровнем ИМТ и не связан с наличием СД2. Анализ количественного показателя ИМТ в зависимости от аллельных вариантов этого локуса показал значимую ассоциацию с уровнем ИМТ в группе испытуемых пациентов с ожирением и нормальным уровнем ИМТ. Более информативной является ассоциация в рецессивной модели ($p = 0.004$), свидетельствующая о протективном эффекте варианта GG при формировании ожирения. Значимых взаимодействий для других локусов показано не было.

Анализ взаимодействий генотипов с внешними факторами (уровень ИМТ и полом) также проводился путем сопоставления величин отношения шансов (OR), рассчитанных для индивидуальных генотипов в группах, дифференцированных по уровню ИМТ и гендерному признаку. Показана ассоциация для локуса rs3736228 гена *LRP5* в дифференцированном по уровню ИМТ анализе. Ассоциация с развитием СД2 была выявлена только в группе больных СД2 с нормальной массой тела (OR = 1.74, $p = 0.012$) и не было выявлено ассоциации в группе больных с ожирением

Таблица 4. Результаты анализа ассоциации полиморфных локусов генов *LRP5*, *LEPR*, *LPL* в группе больных СД2 и контрольной группе

Ген	Полиморфизм	Редкий аллель	Генотип/модель	СД2 N = 486 N (%)	Контроль N = 444 N (%)	OR (CI 95%) p
<i>LRP5</i>	rs3736228	T	CC TC-TT Dominant	381 (78.3) 105 (21.6)	373 (84) 71 (16)	1.45 (1.04–2.03) 0.027
			CC-TC TT Recessive	482 (99.2) 4 (0.8)	443 (99.8) 1 (0.2)	3.68 (0.41–32.98) 0.2
			Log-additive	–	–	1.46 (1.06–2.01) 0.02
<i>LEPR</i>	rs1137100	A	AA GA-GG Dominant	216 (44.4) 270 (55.6)	212 (47.9) 231 (52.1)	1.15 (0.89–1.49) 0.3
			AA-GA GG Recessive	454 (93.4) 32 (6.6)	403 (91) 40 (9)	0.71 (0.44–1.15) 0.16
			Log-additive	–	–	1.02 (0.83–1.26) 0.81
<i>LPL</i>	rs320	G	TT GT-GG Dominant	264 (54.3) 222 (45.7)	265 (59.7) 179 (40.3)	1.24 (0.96–1.62) 0.099
			TT-GT GG Recessive	449 (92.4) 37 (7.6)	422 (95) 22 (5)	1.58 (0.92–2.72) 0.094
			Log-additive	–	–	1.24 (1.00–1.53) 0.046

(OR = 1.31, $p = 0.19$). В группе больных с нормальным уровнем ИМТ ассоциация была выявлена для локуса *LPL* (rs320) (OR = 1.39, $p = 0.027$) (табл. 5).

Оценка гендерных различий статистически значимых различий не выявила.

Анализ ассоциации полиморфных локусов исследованных генов с количественными признаками метаболических нарушений

Ассоциации полиморфных локусов *LEPR* (rs1137100), *LRP5* (rs3736228) и *LPL* (rs320) с биохимическими и антропометрическими показателями в контрольной группе не выявлено. Дальнейший анализ проводился в группе пациентов. Ассоциации полиморфного локуса rs1137100 гена *LEPR* с биохимическими показателями у больных СД2 также не выявлено. Анализ ассоциаций количественных признаков с полиморфными вариантами исследованных генов представлен в табл. 6.

Ассоциация с уровнем ИМТ была выявлена по локусу rs1137100 гена *LEPR* ($p = 0.0067$). Было установлено, что носители генотипа *GG* имели пони-

женный уровень ИМТ, достигающий 26.9 кг/м², в отличие от носителей генотипов *AA* и *AG*, имеющих ИМТ равный 28.9 кг/м².

Анализ количественных антропометрических показателей выявил ассоциацию локуса rs3736228 гена *LRP5* с риском развития ожирения. У носителей генотипа *CC* уровень ИМТ составил 28.53 кг/м², а у испытуемых с генотипами *TC* и *TT* – 29.9 кг/м² ($p = 0.012$). Выявлена ассоциация полиморфного локуса rs3736228 гена *LRP5* с уровнем триглицеридов (ТГ). Показано, что носители генотипа *CC* имели уровень ТГ равный 1.52 ммоль/л, носители генотипов *CT* и *TT* – 2.32 ммоль/л ($p = 0.00000004$).

Показано, что носители генотипа *TT* локуса rs320 гена *LPL* имели сниженный уровень липопротеинов низкой плотности – 2.84 ммоль/л, а у индивидов с генотипами *GT* и *GG* уровень ЛПНП достигал значения 3.24 ммоль/л ($p = 0.04$). Была выявлена статистически значимая зависимость показателя общего холестерина в зависимости от генотипа локуса rs320 гена *LPL*. У индивидов с генотипами *GT* и *GG* отмечалось снижение уровня холестерина до 5.19 ммоль/л по сравнению с ге-

Таблица 5. Анализ ассоциации полиморфных локусов генов *LRP5*, *LEPR*, *LPL* с развитием СД2 в группах, дифференцированных по уровню ИМТ

Группа	Ген, полиморфный локус	Редкий аллель	Генотип или модель	<i>p</i>	OR (CI 95%)
Ожирение	<i>LRP5</i> rs3736228	<i>T</i>	Log-additive <i>CC</i> (0) <i>TC</i> (1) <i>TT</i> (2)	0.19	1.31 (0.87–1.97)
	<i>LEPR</i> rs1137100	<i>A</i>	Log-additive <i>AA</i> (0) <i>GA</i> (1) <i>GG</i> (2)	0.84	0.97 (0.76–1.25)
	<i>LPL</i> rs320	<i>G</i>	Log-additive <i>TT</i> (0) <i>GT</i> (1) <i>GG</i> (2)	0.12	1.23 (0.94–1.60)
Норма	<i>LRP5</i> rs3736228	<i>T</i>	Log-additive <i>CC</i> (0) <i>TC</i> (1) <i>TT</i> (2)	0.012	1.74 (1.12–2.68)
	<i>LEPR</i> rs1137100	<i>A</i>	Log-additive <i>AA</i> (0) <i>GA</i> (1) <i>GG</i> (2)	0.55	0.92 (0.70–1.21)
	<i>LPL</i> rs320	<i>G</i>	Log-additive <i>TT</i> (0) <i>GT</i> (1) <i>GG</i> (2)	0.027	1.39 (1.04–1.85)

нотипом *TT*. Носители этого генотипа имели показатели холестерина равные 5.57 ммоль/л ($p = 0.047$). Показаны статистически значимые различия в возрасте дебюта заболевания в зависимости от генотипов этого локуса. У носителей генотипов *TT* и *GT* диабет манифестировал раньше – в среднем в возрасте 54.8 лет по сравнению с пациентами, имеющими генотип *GG* (59.76 лет, $p = 0.04$).

ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенного исследования подтверждена ассоциация полиморфных локусов генов *LRP5* (rs3736228) и *LPL* (rs320) с развитием СД2 и количественными параметрами, характеризующими СД2, в популяции татар. Эти результаты согласуются с данными других авторов в различных популяциях мира, например у китайцев [14] и испанцев [15]. Наиболее значимая ассоциация получена при анализе уровня триглицеридов. Высокий уровень триглицеридов может обуславливать СД2, заболевания сердца и сосудов. В исследованиях ряда авторов показана взаимосвязь полиморфных вариантов гена *LRP5* с уровнями холестерина в плазме крови модельных животных [16]. Также показана вовлеченность *Wnt/LRP5*-сигнального пути в адипогенез, секрецию инсулина, толерантность к глюкозе. Выключение гена *LRP5* у модельных мышей, находившихся на диете с повышенным содержанием жира, приводило к увеличению уровней холестерина в плазме. При кормлении мышей с дефицитом *LRP5* обычной диетой наблюдалось выраженное нарушение толерантности к глюкозе с выраженным снижением внутриклеточного АТФ и Ca^{2+} в ответ на введение глюкозы и ухудшением инсулинозависимой секреции. Показано, что *LRP5*-дефицитным остров-

кам поджелудочной железы не хватало *Wnt*-стимулированной секреции инсулина. Эти данные свидетельствуют о том, что передача сигналов *Wnt-LRP5* способствует индуцированной глюкозой секреции инсулина в β -островках [16]. Также на модельных животных было показано, что *Wnt/LRP5*-сигнальный путь вовлечен в метаболизм жирных кислот. *Magooi* с соавт. [17] было установлено, что активность *LRP5* модулирует уровень триглицеридов в плазме крови. Полиморфный вариант rs3736228Т гена *LPR5* обуславливает потерю функций этого белка, что в свою очередь приводит к изменению метаболизма липидов [18]. В этой связи полиморфные варианты гена *LRP5* рассматриваются в качестве потенциальных факторов риска в развитии метаболических нарушений [16, 17].

Далее в нашем исследовании была показана ассоциация полиморфного локуса rs320 гена *LPL* с уровнями липидов плазмы крови. Поскольку данный полиморфизм является интронным, ассоциацию связывают не с этим полиморфным вариантом, а с находящимся в полном сцеплении с ним полиморфным локусом экзона 9 (Ser447Ter) [19]. Считается, что локус rs320 гена *LPL* приводит к снижению активности фермента. По данному полиморфному маркеру в литературных источниках развернулась дискуссия. В ряде исследований показана ассоциация с риском развития метаболических расстройств с редким аллелем *G* [20, 21], тогда как по данным других авторов рисковому аллелем был аллель *T* [22]. По данным *Munshi* с соавт. [23], ассоциации с локусом rs320 гена *LPL* в популяции индийцев показано не было. В работе *Тао Не* с соавт. [22] выдвигается предположение, что аллель *G* проявляет протективную роль в популяциях Азии, но не Европы, поскольку у европейцев

Таблица 6. Ассоциация полиморфных вариантов генов *LRP5*, *LEPR*, *LPL* с клиническими и биохимическими параметрами СД2

Параметры	<i>LRP5</i> rs3736228 M (S.E)			p	<i>LEPR</i> rs1137100 M (S.E)			p	<i>LPL</i> rs320 M (S.E)			p
	CC	TC	TT		AA	GA	GG		TT	GT	GG	
Возраст дебюта СД2, лет	54.94 (0.77)	57 (1.66)	46 (6)	0.21	54.42 (0.99)	55.7 (1.05)	57.5 (2.41)	0.45	59.76 (2.25)	54.81 (0.72)	0.04	
Вес, кг	80.04 (1.14)	85.38 (3.28)	84 (12)	0.17	82.04 (1.6)	80.08 (1.66)	81.71 (4.35)	0.69	82.08 (1.54)	80.9 (1.83)	75.47 (3)	0.27
ИМТ, кг/м ²	28.53 (0.23)	29.9 (0.48)		0.012	28.94 (0.21)		26.95 (0.74)	0.0067	28.53 (0.26)	29.09 (0.33)		0.18
ОТ, см	98.64 (0.96)	101.38 (2.42)	99 (10)	0.5	99.22 (1.16)	99.36 (1.62)	98 (2.94)	0.92	99.22 (1.22)	98.8 (1.41)	101.21 (3.37)	0.8
Глюкоза натощак, ммоль/л	7.21 (0.16)	7.42 (0.36)	7.35 (1.05)	0.85	7.17 (0.18)	7.43 (0.24)	6.54 (0.3)	0.27	7.4 (0.2)	7.15 (0.25)	6.65 (0.23)	0.32
НbA1c, %	7.51 (0.09)	7.38 (0.08)	7.25 (0.35)	0.73	7.39 (0.08)	7.63 (0.13)	7.16 (0.1)	0.12	7.49 (0.1)	7.54 (0.13)	7.25 (0.11)	0.58
C-пептид, нг/мл	2.31 (0.09)	2.17 (0.24)	1.11 (0.35)	0.34	2.18 (0.1)	2.36 (0.14)	2.26 (0.51)	0.62	2.22 (0.11)	2.28 (0.13)	2.53 (0.46)	0.63
Холестерин, ммоль/л	5.44 (0.09)	5.43 (0.21)	5 (1.1)	0.87	5.46 (0.11)	5.4 (0.13)	5.44 (0.18)	0.94	5.19 (0.1)	5.57 (0.11)		0.027
ТГ, ммоль/л	1.52 (0.07)	2.32 (0.39)		0.00000004	1.72 (0.15)	1.63 (0.14)	1.64 (0.19)	0.89	1.65 (0.1)	1.72 (0.17)	1.65 (0.22)	0.94
ЛПНП, ммоль/л	3.04 (0.11)	3.18 (0.24)	2.49 (0.71)	0.73	3.13 (0.14)	3.07 (0.15)	2.5 (0.3)	0.29	2.84 (0.14)	3.24 (0.14)		0.047
ЛПВП, ммоль/л	1.18 (0.04)	1.31 (0.08)	1.23 (0.6)	0.42	1.19 (0.05)	1.22 (0.05)	1.2 (0.16)	0.91	1.26 (0.06)	1.13 (0.05)	1.2 (0.07)	0.29

Примечание. M (S.E) – средние значения и стандартная ошибка среднего, p – уровень значимости для критерия Манна–Уитни или Крускала–Уоллиса. ОТ – объем талии, HbA1c – гликированный гемоглобин, ТГ – триглицериды, ЛПНП – липопротеины низкой плотности, ЛПВП – липопротеины высокой плотности.

прослеживается обратная взаимосвязь с аллелем *G* [22, 24].

Нами показано, что вариант аллеля *G* является рискованным при развитии СД2 у лиц с нормальной массой тела, а также выявлена взаимосвязь данного варианта с повышенным уровнем холестерина и ЛПНП. Эти данные согласуются с полученными результатами Бушуевой и соавт. [24] в популяции русских, Javorský с соавт. [20] в популяции словаков, Vardar с соавт. [21] в турецкой популяции. Они показали, что генотип *GG* локуса rs320 гена *LPL* является маркером развития СД2 и дислипидемии [20–24]. Возможной взаимосвязи с гендерной принадлежностью нами выявлено не было.

Известно, что лептиновый рецептор (*LEPR*) играет ключевую роль в контроле массы тела, энергетического метаболизма и чувствительности к инсулину. Нами было проведено исследование для оценки ассоциаций генетических вариантов *LEPR* с развитием СД2. В нашем исследовании установлена взаимосвязь полиморфных вариантов локуса *LEPR* rs1137100 с уровнем массы тела; показано, что генотип *GG* является протективным маркером ожирения, но не имеет отношения к развитию СД2. В крупном метаанализе Yang и Niu [25] по изучению локуса K109R (rs1137100) также показано отсутствие статистически значимой взаимосвязи между полиморфными вариантами данного маркера и риском развития СД2 в различных популяциях мира. По результатам GWAS аллель *G* обуславливает снижение уровня растворимой формы рецептора лептина (*sOb-R*) [26]. Согласно данным литературы существует обратная пропорциональная зависимость между уровнем рецептора в сыворотке крови и массой тела. С другой стороны, в исследовании Долгушиной с соавт. [27] у русских повышенный уровень лептина был выявлен у носителей аллеля *G* локуса K109R. Ассоциация локуса *LEPR* rs1137100 для аллеля *A* с ожирением показана в исследованиях Rosmond с соавт. [28] у шведов, Okada с соавт. [29] у мексиканцев. По данным других авторов статистически значимых различий с данным локусом при ожирении не выявлено [30]. Получаемые противоречивые результаты свидетельствуют о наличии воздействий внешнесредовых факторов (например, гендерная принадлежность) и о межпопуляционных различиях в распределении частот полиморфного локуса гена *LEPR*.

Нами была выявлена ассоциация полиморфных вариантов гена *Wnt*-сигналинга (*LRP5*) и гена липопротеинлипазы (*LPL*) с развитием СД2 в популяции татар. Представленный анализ ассоциаций подтверждает роль этих генов в развитии сахарного диабета 2-го типа. Показано, что полиморфные варианты гена *LEPR* (rs1137100) ассоциированы только с ожирением, но не являются

маркерными в отношении СД2. Определены патогенетически значимые взаимодействия исследованных маркеров с показателями липидного обмена у больных. Полученные результаты представляют интерес для понимания молекулярных механизмов развития СД2.

Исследование частично поддержано Российским фондом фундаментальных исследований (№ 18-015-00050) и Министерством науки и высшего образования Российской Федерации № АААА-А16-116020350032-1.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дедов И.И., Шестакова М.В., Сунцов Ю.И. Сахарный диабет в России: проблемы и решения. М., 2008. 14 с.
2. Белоусова О.Н., Сиротина С.С., Якупченко Т.И., Жернакова Н.И. Молекулярные и генетические механизмы патогенеза сахарного диабета 2-го типа // Науч. ведомости Белгородского гос. ун-та. Серия: Медицина. Фармация. 2015. Т. 31. № 16. С. 213.
3. Oswal A., Yeo G. Leptin and the control of body weight: a review of its diverse central targets, signaling mechanisms, and role in the pathogenesis of obesity // Obesity. 2010. V. 18. № 2. P. 221–229. doi 10.1038/oby.2009.228
4. Winick J.D., Stoffel M., Friedman J.M. Identification of microsatellite markers linked to the human leptin receptor gene on chromosome 1 // Genomics. 1996. V. 36. № 1. P. 221–222. doi 10.1006/geno.1996.0455
5. Emilsson V., Liu Y.L., Cawthorne M.A. Expression of the functional leptin receptor mRNA in pancreatic islets and direct inhibitory action of leptin on insulin secretion // Diabetes. 1997. V. 46. № 2. P. 313–316. doi 10.2337/diab.46.2.313
6. Foer D., Zhu M., Cardone R.L. et al. Impact of gain-of-function mutations in the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) on glucose and lipid homeostasis // Osteoporosis Intern. 2017. V. 28. № 6. P. 2011–2017. doi 10.1007/s00198-017-3977-4
7. Guo Y.F., Xiong D.H., Shen H., Zhao L.J. et al. Polymorphisms of the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) gene are associated with obesity phenotypes in a large family-based association study // J. Med. Genet. 2006. V. 43. № 10. P. 798–803. doi 10.1590/S0100-879X2000001100006
8. Cho Y.S., Go M.J., Han H.R. et al. Association of lipoprotein lipase (LPL) single nucleotide polymorphisms with type 2 diabetes mellitus // Experim. Mol. Med. 2008. V. 40. № 5. P. 523. doi 10.3858/emm.2008.40.5.523
9. Ahn Y.I., Kamboh M.I., Hamman R.F. et al. Two DNA polymorphisms in the lipoprotein lipase gene and their associations with factors related to cardiovascular disease // J. Lipid Res. 1993. V. 34. № 3. P. 421–428.
10. Goodarzi M.O., Guo X., Taylor K.D. et al. Lipoprotein lipase is a gene for insulin resistance in Mexican Americans // Diabetes. 2004. V. 53. № 1. P. 214–220. doi 10.2337/diabetes.53.1.214
11. Трофимова Н.В., Литвинов С.С., Хусаинова Р.И. и др. Генетическая характеристика поволжских та-

- тар по данным об однородительских маркерах // Изв. Самарского науч. центра РАН. 2013. № 15. С. 3–5.
12. Purcell S., Neale B., Todd-Brown K. et al. PLINK: a toolset for whole genome association and population based linkage analysis // *Am. J. Hum. Genet.* 2007. V. 81. № 3. P. 559–575. doi 10.1086/519795
 13. Statistica v. 6.0 program (StatSoft Inc., USA) (<http://www.statistica.com>).
 14. Xuan M., Wang Y., Wang W. et al. Association of LRP5 gene polymorphism with type 2 diabetes mellitus and osteoporosis in postmenopausal women // *Intern. J. Clin. Experim. Med.* 2014. V. 7. № 1. P. 247.
 15. Ariza M.J., Sánchez-Chaparro M.Á., Barón F.J., et al. Additive effects of LPL, APOA5 and APOE variant combinations on triglyceride levels and hypertriglyceridemia: results of the ICARIA genetic sub-study // *BMC Med. Genet.* 2010. V. 11. № 1. P. 66.
 16. Fujino T., Asaba H., Kang M.J. et al. Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) is essential for normal cholesterol metabolism and glucose-induced insulin secretion // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2003. V. 100. № 1. P. 229–234. doi 10.1073/pnas.0133792100
 17. Magoori K., Kang M.J., Ito M.R. et al. Severe hypercholesterolemia, impaired fat tolerance, and advanced atherosclerosis in mice lacking both low density lipoprotein receptor-related protein 5 and apolipoprotein E // *J. Biol. Chemistry.* 2003. V. 278. № 13. P. 11331–11336. doi 10.1074/jbc.M211987200
 18. Borrell-Pagès M., Romero J.C., Badimon L. LRP5 deficiency down-regulates Wnt signalling and promotes aortic lipid infiltration in hypercholesterolaemic mice // *J. Cell. Mol. Med.* 2015. V. 19. № 4. P. 770–777. doi 10.1111/jcmm.12396
 19. Rip J., Nierman M.C., Ross C.J. et al. Lipoprotein lipase S447X: a naturally occurring gain-of-function mutation // *Arteriosclerosis, Thrombosis, Vascular Biol.* 2006. V. 26. № 6. P. 1236–1245. doi 10.1161/01.ATV.0000219283.10832.43
 20. Javorský M., Gašperíková D., Ukropec J. et al. Lipoprotein lipase HindIII polymorphism influences HDL-cholesterol levels in statin-treated patients with coronary artery disease // *Wiener Klin. Wochenschrift.* 2007. V. 119. № 15–16. P. 476–482. doi 10.1007/s00508-007-0824-1
 21. Vardarlı A.T., Harman E., Çetintaş V.B. et al. Polymorphisms of lipid metabolism enzyme-coding genes in patients with diabetic dyslipidemia // *Anatolian J. Cardiology.* 2017. V. 17. № 4. P. 313. doi 10.14744/Anatol-JCardiol.2016.7142
 22. He T., Wang J., Deng W.S., Sun P. Association between lipoprotein lipase polymorphism and the risk of stroke: A meta-analysis // *J. Stroke and Cerebrovascular Dis.* 2017. V. 26. № 11. P. 2570–2578. doi 10.1016/j.jstroke-cerebrovasdis.2017.06.003
 23. Munshi A., Babu M.S., Kaul S. et al. Association of LPL gene variant and LDL, HDL, VLDL cholesterol and triglyceride levels with ischemic stroke and its subtypes // *J. Neurological Sci.* 2012. V. 31. № 1. P. 51–54. doi 10.1016/j.jns.2012.04.006
 24. Бушуева О.Ю., Стецкая Т.А., Корогодина Т.В. и др. Исследование взаимосвязи полиморфизмов HindIII гена LPL и Taq1b гена CETP с риском развития атеротромботического инсульта у жителей Центральной России // *Терапевт. архив.* 2015. Т. 87. № 8. С. 86–91. doi 10.17116/terarkh201587886-91
 25. Yang Y., Niu T. A meta-analysis of associations of LEPR Q223R and K109R polymorphisms with type 2 diabetes risk // *PLoS One.* 2018. V. 13. № 1. e0189366. doi 10.1371/journal.pone.0189366
 26. Sun Q., Cornelis M.C., Kraft P. et al. Genome-wide association study identifies polymorphisms in LEPR as determinants of plasma soluble leptin receptor levels // *Hum. Mol. Genet.* 2010. V. 19. № 9. P. 1846–1855. doi 10.1093/hmg/ddq056
 27. Долгушина Н.В., Десяткова Н.В., Донников А.Е. и др. Роль адипокинов и генов-регуляторов адипокинов в эффективности программ вспомогательных репродуктивных технологий у пациенток с избыточной массой тела // *Акушерство и гинекология.* 2017. Т. 2. № 71–78. doi 10.18565/aig.2017.2.71-8
 28. Rosmond R., Chagnon Y.C., Holm G. et al. Hypertension in obesity and the leptin receptor gene locus // *J. Clin. Endocrinol. Metabolism.* 2000. V. 85. № 9. P. 3126–3131. doi 10.1210/jcem.85.9.6781
 29. Okada T., Ohzeki T., Nakagawa Y. et al. Impact of leptin and leptin-receptor gene polymorphisms on serum lipids in Japanese obese children // *Acta Paediatrica.* 2010. V. 99. № 8. P. 1213–1217. doi 10.1111/j.1651-2227.2010.01778.x
 30. Hollensted M., Ahluwalia T.S., Have C.T. et al. Common variants in LEPR, IL6, AMD1, and NAMPT do not associate with risk of juvenile and childhood obesity in Danes: a case-control study // *BMC Med. Genet.* 2015. V. 16. № 1. P. 105. doi 10.1186/s12881-015-0253-3

The Association of *LEPR* (rs1137100), *LRP5* (rs3736228) and *LPL* (rs320) Gene Polymorphisms and Risk of Type 2 Diabetes Mellitus

O. V. Kochetova^{a,*}, D. S. Avzaletdinova^b, L. F. Sharipova^b, G. F. Korytina^a,
L. Z. Akhmadishina^a, T. V. Morugova^b, and O. E. Mustafina^a

^aInstitute of Biochemistry and Genetics Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia

^bBashkortostan State Medical University, Ufa, 450000 Russia

*e-mail: Olga_mk78@mail.ru

Diabetes mellitus is a group of multifactorial diseases characterised by hereditary predisposition. However, the genetic mechanisms of its development are not fully understood. In this study we examined single nucle-

otide polymorphisms in candidate genes for obesity among patients with type 2 diabetes. We carried out a study of the association *LRP5* (rs3736228), *LEPR* (rs1137100) and *LPL* (rs320) gene polymorphisms in the development of type 2 diabetes. The *LRP5* (rs3736228) for the T allele was associated with type 2 diabetes ($p = 0.029$, OR = 1.46). The *LEPR* (rs1137100) was associated with obesity (body mass index) ($p = 0.032$). But rs3736228 of the *LRP5* (OR = 1.74, $p = 0.012$) and rs320 of the *LPL* gene (OR = 1.39, $p = 0.027$) were associated with type 2 diabetes only in the group of patients without obesity. The polymorphism rs320 *LPL* gene showed a significant association with impaired level of lipoproteins ($p = 0.04$) and cholesterol ($p = 0.027$). The *LRP5* rs3736228 CC genotype was associated with a decrease in the level of body mass index ($p = 0.012$) and a decrease in level of triglycerides ($p = 0.00000004$).

Keywords: diabetes mellitus 2, lipoproteinlipase, leptin receptor, Wnt-signaling gene, polymorphic marker.