

Л.А. АТРАМЕНТОВА¹, В.В. ПОЛТОРАК¹,
Т.В. ТЫЖНЕНКО¹, М.Ю. ГОРШУНСКАЯ²,
А.К. ПОЧЕРНЯЕВ¹

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

² Харьковская медицинская академия последипломного образования
E-mail: wshkoda23@rambler.ru

ОДНОНУКЛЕОТИДНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ +276G>T ГЕНА АДИПОНЕКТИНА (*APM1*) У ДОНОРОВ ХАРЬКОВА



*На образцах крови 103 доноров (65 мужчин и 38 женщин) – жителей Харькова, из которых 70 были украинцами и 33 русскими, исследован полиморфизм +276G>T гена адипонектина (*APM1*). Частоты аллелей T и G у мужчин и женщин, а также у русских и украинцев значимо не различаются и в общей группе составляют $p_T = 0,55$ и $p_G = 0,45$. Распределение генотипов не соответствует соотношению Харди-Вайнберга: доля гетерозигот превосходит селективно-нейтральное значение в 1,55 раза, доля гомозигот TT составляет 0,55, гомозигот GG – 0,33 от равновесного значения.*

© Л.А. АТРАМЕНТОВА, В.В. ПОЛТОРАК, Т.В. ТЫЖНЕНКО,
М.Ю. ГОРШУНСКАЯ, А.К. ПОЧЕРНЯЕВ, 2010

Введение. Ген адипонектина *APM1*, состоящий из трех экзонов и двух интронов, находится на длинном плече хромосомы 3 в локусе 3q27 [1] и экспрессируется в адипозной ткани [2]. Продукт этого гена – белок адипонектин, обладающий противовоспалительным [3] и анти-склеротическим действием [4], регулирует β -окисление жирных кислот [5], поддерживает уровень глюкозы в скелетных мышцах и печени [6, 7]. Уровень сывороточного адипонектина у человека отрицательно коррелирует с инсулиновой резистентностью, при ожирении и сахарном диабете 2-го типа обнаруживается гипoadипонектинемия [4, 5], а индивиды с высоким уровнем адипонектина имеют меньший риск развития сахарного диабета 2-го типа [6]. У инсулин-резистентных индивидов лекарственные препараты, направленные на коррекцию чувствительности к инсулину, увеличивают уровень плазменного адипонектина, что снижает инсулиновую резистентность. При потере веса у человека усиливается продукция эндогенного адипонектина, а у пациентов с анорексией уровень плазменного адипонектина резко повышен [8, 9]. Перечисленные функции адипонектина порождают естественный интерес к гену *APM1*, который его кодирует. Для понимания связи между геном и метаболизмом изучены разные полиморфизмы, и к настоящему времени исследовано более десяти его видов. Связь между полиморфизмами гена *APM1* и ожирением, инсулиновой резистентностью и сахарным диабетом 2-го типа отмечалась разными авторами [10–12], что позволяет рассматривать *APM1* в качестве кандидатного гена инсулинорезистентности [13]. В настоящее время наиболее интенсивно изучается однонуклеотидный полиморфизм (single nucleotide polymorphism, SNP), представляющий собой замену гуанина (G) на тимин (T) во втором интроне (SNP +276G>T). Именно этот вид полиморфизма, как показано на ряде этнических групп и популяций, ассоциирован с сахарным диабетом 2-го типа: обладатели генотипа GG имеют более низкий уровень циркулирующего адипонектина, чем обладатели генотипов TT и GT [12]. Протекторная роль аллеля T отмечена и по отношению к сердечно-сосудистым событиям [14]. Повышенный риск сахарного диабета имеется у индивидов с генотипом GG в японской популяции [6]. Предполагают также, что этот генотип связан с нарушенной глюкозной

толерантностью [15]. Аллель *T* ассоциирован с повышенным уровнем адипонектина у японцев [6] и французов [16]. Аллель *G* ассоциирован с пониженной инсулиновой чувствительностью и повышенным индексом массы тела у немцев [17]. В отличие от перечисленных авторов, Menzaghi et al. [18] считают, что риск гипергликемии повышает аллель *T*, а в исследованиях, проведенных во французской [16], шведской [19, 20] популяциях, индейцах Pima [21], связи между геном адипонектина и диабетом не обнаружено. Корейские исследователи установили, что полиморфизм 276G>T определяет ответную реакцию на потерю веса субъектами с избыточной массой по показателю циркулирующего адипонектина и инсулиновой резистентности [22].

Несоответствие результатов, получаемых разными авторами относительно ассоциаций гена адипонектина с сахарным диабетом, ожирением и другими составляющими метаболического синдрома, вызывает дискуссии среди ученых. Высказываются соображения относительно источников наблюдаемых разногласий. Среди причин называют статистическую флуктуацию, связанную с размером выборок, статистические погрешности, вызванные эффектом множественных сравнений, работой на смещенных выборках. К источникам несоответствия результатов относят несопоставимость генофондов у представителей разных этнических групп и популяций, неучет пола и возраста обследованных. Помехи могут быть связаны с неодинаковой семейной историей обследованных, могут не совпадать критерии при формировании контрольной группы. Все это делает необходимым проводить исследования на конкретных популяциях.

Большинство работ посвящено исследованию ассоциации между геном *APM1* и уровнем адипонектина у больных сахарным диабетом 2-го типа, а данных о распределении полиморфизмов в общих популяциях немного. Между тем информация о частоте аллелей и генотипов является той базой, на которой основываются исследования по выявлению связи полиморфизмов с заболеваниями и которая дает возможность рассчитать относительный риск, уникальный для отдельных популяций. Все изложенное определило цель

настоящего исследования: определить оценки частот аллелей и генотипов по локусу 276 гена адипонектина у населения Харькова.

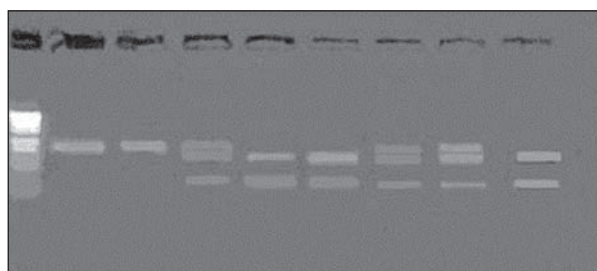
Материалы и методы. На базе Харьковской областной станции переливания крови были собраны образцы крови 103 человек (65 мужчин и 38 женщин в возрасте от 20 до 60 лет), не состоящих в родстве. Обследование осуществляли при письменном согласии доноров. ДНК выделяли из лейкоцитов при помощи ионообменной смолы Челекс-100 (Chelex-100) [23].

Однонуклеотидную замену, локализованную во втором интроне гена адипонектина (SNP +276G>T), определяли путем амплифицирования в полимеразной цепной реакции. Использовали прямой (APM276F GGCCTCTTTCATCACAGACC) и обратный (APM276R AGATGCAGCAAAGCCAAAGT) праймеры, а также эндонуклеазу *BsmI* (*BsaMI*, MvaI269I) [24, 25], а в качестве маркера молекулярной массы — ДНК *pUC19*, гидролизованную эндонуклеазой *MspI*. Разделение фрагментов ДНК после рестрикции проводили с помощью электрофореза в 2%-ном агарозном геле. Электрофореграмма ПЦР-продуктов (рисунок) дает представление о генотипах доноров по гену *APM1*.

В исследуемых пробах одна полоска, соответствующая фрагменту ДНК размером 196 пар нуклеотидов (п.н.), в образцах 1 и 2 указывает на гомозиготный генотип *GG*. В образцах 4, 5 и 8 (генотип *TT*) две полоски представляют фрагменты ДНК длиной 135 и 62 п.н. Три полоски (199, 134 и 62 п.н.) в образцах 3, 6 и 7 свидетельствуют о гетерозиготном генотипе *TG*.

Проверку статистических гипотез об ассоциации изученных аллелей с полом и этнической принадлежностью доноров, а также сравнение фактического и теоретического ряда проводили с помощью критерия χ^2 на уровне значимости $p \leq 0,05$.

Результаты исследований и их обсуждение. У 103 практически здоровых индивидов частоты генотипов по полиморфизму +276G>T гена *APM1* распределились таким образом: 17 человек были гомозиготами *TT*, 7 — гомозиготами *GG*, 79 человек имели гетерозиготный генотип *GT* (таблица). Частоты аллелей в группе мужчин составили $p_G = 0,44$ и $p_T = 0,56$, в группе женщин $p_G = 0,47$ и $p_T = 0,53$. Поскольку разница между этническими группами также ока-



М 1 2 3 4 5 6 7 8

Электрофореграмма продуктов ПЦР специфической последовательности ДНК, генотипированной по SNP-полиморфизму гена *APM1* в Region IVS2+62G>T: 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 п.н. (подчеркнуты фрагменты, которые не видны в агарозном геле); 1–8 – ДНК доноров с различными генотипами

Результаты генотипирования по полиморфизму +276G>T гена *APM1*

Генотипы	Пол, <i>n</i>		Национальность, <i>n</i>		Фактическое <i>n</i>	Теоретическое <i>n</i>
	Мужской	Женский	Украинцы	Русские		
<i>TT</i>	10	7	13	4	17	31
<i>TG</i>	53	26	53	26	79	51
<i>GG</i>	2	5	4	3	7	21
<i>p_T</i>	0,56	0,53	0,56	0,52	0,55	
<i>p_G</i>	0,44	0,47	0,44	0,48	0,45	
Статистики	$\chi^2 = 0,24;$ $df = 1,$		$\chi^2 = 0,43;$ $df = 1,$		$\chi^2 = 31,0;$ $df = 1,$	
	$\chi^2_{st} = 3,84;$ $p < 0,05$		$\chi^2_{st} = 3,84;$ $p < 0,05$		$\chi^2_{st} = 3,84;$ $p < 0,001$	

Примечание. *n* – число обследованных, *p_T* и *p_G* – частоты аллелей *T* и *G*, χ^2 и χ^2_{st} – фактическое и пороговое значение критерия; *df* – число степеней свободы; *p* – уровень значимости.

залась статистически не значимой, их объединили. Вычислив частоты аллелей для общей группы (*p_G* = 0,45, *p_T* = 0,55), рассчитали теоретическое число генотипов для панмиктической популяции. Фактическое соотношение генотипов (17*TT* : 79*TG* : 7*GG*) не соответствует соотношению Харди-Вайнберга (31*TT* : 51*TG* : 21*GG*). В изученной группе удельный вес гетерозигот *TG* оказался в 1,55 раза больше, а число гомо-

зигот меньше, чем при панмиксии (*TT* составляет 0,55, а *GG* – 0,33 от теоретически ожидаемого).

На данном этапе исследования трудно сказать, чем вызвано отклонение в распределении генотипов от соотношения, характерного для селективно-нейтрального локуса в панмиктической популяции. В качестве обсуждения можно привести следующее. К избытку гетерозигот, как известно, приводит отрицательное ассортативное скрещивание (отрицательная брачная ассортативность) по признакам, сопряженным с анализируемым локусом. Теоретически такое возможно, но практически трудно представить признак, влияющий на выбор брачного партнера и находящийся по контролю локуса *APM1*. Более реалистичным, на наш взгляд, представляется идея о том, что упомянутый локус является селективно значимым. Снижение числа гомозигот может быть результатом отбора в пользу гетерозиготных генотипов. На какой стадии действует этот отбор? Учитывая, что в изученном населении до взрослого состояния доживают почти 98 % родившихся [26], можно предположить, что отбор происходит на пренатальной стадии. Как именно он осуществляется – путем избирательного гетерогамного оплодотворения или частичной элиминацией гомозигот, сказать сложно, но последняя мысль кажется нам более правдоподобной. Стоит обратить внимание и на такое обстоятельство. Исследованная группа сформирована из доноров крови, к здоровью которых, как известно, предъявляются довольно жесткие требования. Это люди без признаков ишемической болезни сердца, сахарного диабета и артериальной гипертонии. По этой причине в нее не попала часть населения с сердечно-сосудистыми проблемами и признаками метаболического синдрома. Такая ситуация возможна, если ген *APM1* действительно ассоциирован с заболеваниями, по которым определяется непригодность к донорству. Хотя гипотеза требует специальной проверки, найденные популяционно-генетические характеристики могут быть использованы в качестве отправной точки при поиске молекулярных маркеров наследственной предрасположенности к заболеваниям, в патогенезе которых участвует адипонектин. Знание региональных спектров полиморфиз-

ма позволит разработать быстрые методы тестирования широко распространенных патогенных вариантов и ускорить обнаружение генных дефектов у людей, составляющих группы риска.

L.A. Atramentova, V.V. Poltorak, T.V. Tyzhnenko,
M.Yu. Gorshunskaya, A.R. Pochernyaev

SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM
OF +276G>T ADIPONECTINE (APM1) GENE
IN DONORS OF KHARKIV POPULATION

Polymorphism of adiponectine (APM1) gene in +276G>T position was studied. For this research we used blood samples of 103 donors (men/women: 65/38; 70 Ukrainian, 33 Russian) – habitants of Kharkiv. Frequencies of T and G alleles were $p_T = 0,55$ and $p_G = 0,45$ in a general group. They did not meaningfully differentiate either for men and women or for Russians and Ukrainians. Distribution of genotypes did not correspond to Hardy-Weinberg equilibrium: share of heterozygotes was 1.55 times higher than selectively-neutral value, share of TT homozygote is 0.55, and GG homozygote is 0.33 of equilibrium value.

Л.О. Атраментова, В.В. Полторак, Т.В. Тижненко,
М.Ю. Горшунська, А.К. Почерняев

ОДНОНУКЛЕОТИДНИЙ ПОЛІМОРФІЗМ
+276G>T ГЕНА АДІПОНЕКТИНУ (APM1)
У ДОНОРІВ ХАРКОВА

На зразках крові 103 донорів (65 чоловіків і 38 жінок) – жителів Харкова, з яких 70 були українцями і 33 росіянами, досліджено поліморфізм +276G>T гена адипонектину (APM1). Частоти алелів T і G у чоловіків і жінок, а також у росіян та українців значущо не відрізняються і в загальній групі становлять $p_T = 0,55$ і $p_G = 0,45$. Розподіл генотипів не відповідає співвідношенню Харді-Вайнберга: частка гетерозигот перевершує селективно нейтральне значення в 1,55 разу, частка гомозигот TT складає 0,55, гомозигот GG – 0,33 від рівноважного значення.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. GenBank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. GenBank is the NIH genetic sequence database, an annotated collection of all publicly available DNA sequences.
2. Yang W.S., Hsiung C.A., Ho L.T. et al. Genetic epistasis of adiponectin and PPAR γ 2 genotypes in modulation of insulin sensitivity: a family-based association study // Diabetologia. – 2003. – 465. – P. 977–983.
3. Ouchi N., Kihara S., Arita Y. et al. Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin // Circulation. – 1999. – 100. – P. 2473–2476.
4. Горшунська М.Ю., Караченцев Ю.І., Красова Н.С. та ін. Рівні адипонектину в циркуляції хворих на

цукровий діабет 2 типу за співставленням до класичних та новітніх чинників атерогенезу // Ендокринологія. – 2007. – 12, № 2. – С. 252–261.

5. Vimalaswaran K.S., Radha V., Ramya K. et al. A novel association of a polymorphism in the first intron of adiponectin gene with type 2 diabetes, obesity and hypoadiponectinemia in Asian Indians // Hum. Genet. – 2008. – 123, № 6. – P. 599–605.
6. Hara K., Boutin P., Mori Y. et al. Genetic variation in the gene encoding adiponectin is associated with an increased risk of type 2 diabetes in the Japanese population // Diabetes. – 2002. – 51. – P. 536–540.
7. Fumeron F., Aubert R., Siddiq A. et al. Adiponectin gene polymorphisms and adiponectin levels are independently associated with the development of hyperglycemia during a 3-year period // Diabetes. – 2004. – 53. – P. 1150–1157.
8. Mackevics V., Heid I.M., Wagner S.A. et al. The adiponectin gene is associated with adiponectin levels but not with characteristics of the insulin resistance syndrome in healthy Caucasians // Eur. J. Human Genet. – 2006. – 14. – P. 349–356.
9. Berthier M-T., Houde A., Côte M. et al. Impact of adiponectin gene polymorphisms on plasma lipoprotein and adiponectin concentrations of viscerally obese men // J. Lipid Res. – 2005. – 46. – P. 237–244.
10. Ohashi K., Ouchi N., Kihara S. et al. Adiponectin 1164T mutation is associated with the metabolic syndrome and coronary artery disease // J. Amer. Coll Cardiol. – 2004. – P. 1195–2000.
11. Hu F.B., Doria A., Meigs J.D. et al. Genetic a variation of the adiponectin locus and risk of type 2 diabetes in women // Diabetes. – 2004. – 53. – P. 209–231.
12. Tso A.W.K., Sham P.C., Wat N.M.S. et al. Polymorphism of the gene encoding adiponectin and outcome of Chinese subjects with impaired glucose tolerance: a 5-year follow-up study // Diabetologia. – 2006. – 49. – P. 1806–1815.
13. Kissenbah A.H., Sonnenberg G.E., Myklebust J. et al. Quantitative trait loci on chromosomes 3 and 17 influence phenotypes of the metabolic syndrome // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 2000. – 97. – P. 144478–14483.
14. Lu Qi, Tricia Li, Eric Rim et al. The +276 polymorphism of the APM1 gene, plasma adiponectin concentration, and cardiovascular risk in diabetic men // Diabetes. – 2005. – 54. – P. 1607–1610.
15. Gonzalez-Sanchez J.L., Zabena C.A., Martinez-Larad M.T. et al. An SNP in the adiponectin gene is associated with decreased serum adiponectin levels and risk for impaired glucose tolerance // Obes. Res. – 2005. – 13. – P. 807–812.
16. Vasseur F., Helbecque N., Dina C. et al. Single-nucleotide polymorphism haplotypes in both proximal promoter and exon 3 of the APM1 gene modulate adipocyte-secreted adiponectin-hormone levels and

- contribute to the genetic risk for type 2 diabetes in French Caucasians // *Hum. Mol. Genet.* – 2002. – **11**. – P. 2607–2614.
17. *Stumvoll M., Tschritter O., Fritsche A. et al.* Association of the T-G polymorphism in adiponectin (exon 2) with obesity and insulin sensitivity // *Diabetes.* – 2002. – **51**. – P. 37–41.
 18. *Menzaghi C., Ercolo T., Paola R.D. et al.* A haplotype at the adiponectin locus is associated with obesity and other features of the insulin resistance syndrome // *Diabetes.* – 2002. – **51**. – P. 2306–2312.
 19. *Gu H.F., Abulaiti A., Östenson C et al.* Single-nucleotide polymorphisms in the promoter region of the adiponectin (APM1) gene are associated with type 2 diabetes in Swedish Caucasians // *Diabetes.* – 2004. – **53** (Suppl 1). – S31–S35.
 20. *Ukkola O., Ravussin E., Jacobson P., Sjöström L., Bouchard C.* Mutations in the adiponectin gene in lean and obese subjects from the Swedish obese subjects cohort // *Metabolism* – 2003. – **52**. – P. 881–884.
 21. *Vozarova de Courten B., Hansoon R.L., Funahashi T. et al.* Common polymorphisms in the adiponectin gene ACDC are not associated with diabetes in Pima Indians // *Diabetes.* – 2005. – **54**. – P. 284–289.
 22. *Shin M.J., Jang Y., Koh S.J. et al.* The association of SNP276GT at adiponectin gene with circulating adiponectin and insulin resistance in response to mild weight loss // *Int. J. Obes. (Lond).* – 2006. – **30**. – P. 1702–1708.
 23. *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.
 24. *Pollin T.I., Tanner K., O'Connell J.R. et al.* Linkage of plasma adiponectin levels to 3q27 explained by association with variation in the APM1 gene // *Diabetes.* – 2005. – **54**. – P. 268–274.
 25. *Loos R.J.F., Ruchat S., Rankinen T. et al.* Adiponectin and adiponectin receptor gene variants in relation to resting metabolic rate, respiratory quotient, and adiposity-related phenotypes in the Québec Family Study // *Amer. J. Clin. Nutr.* – 2007. – **85**, № 1. – P. 26–34.
 26. *Людський розвиток в Україні: інноваційний вимір /* За ред. Лібанова. – К., 2008. – 315 с.

Поступила 02.07.09