



О.Я. Бабак, О.В. Колеснікова, І.В. Шуть
ДУ «Інститут терапії імені Л.Т. Малої НАМН України»,
Харків

Взаємозв'язок між вмістом адипонектину, вісцерального жиру та поліморфним геном ADIPOR1 у хворих на неалкогольну жирову хворобу печінки

Ключові слова

Неалкогольна жирова хвороба печінки, вісцеральний жир, поліморфізм гена ADIPOR1.

Неалкогольна жирова хвороба печінки (НАЖХП) нині є найпоширенішою нозологією серед захворювань печінки. Формування НАЖХП патогенетично пов'язане з розвитком ожиріння, а її вираженість корелює зі ступенем останнього. Існує багато доказів того, що розподіл жирової тканини в організмі відіграє провідну роль у формуванні метаболічних ускладнень ожиріння [5]. Нині жирову тканину розглядають як ендокринний орган. Вісцеральна жирова тканина через її біологічні властивості вносить значний вклад у підвищення патогенності ожиріння.

Для жирової тканини характерна нерівномірність розподілу в організмі. Розподіл жиру в організмі є важливішим за загальну кількість жирової тканини при ожирінні. Жирові відкладення переважно у верхній половині тіла підвищують ризик розвитку метаболічних ускладнень ожиріння, зокрема жирової інфільтрації печінки, особливо за наявності внутрішньочеревного жиру. У більшості пацієнтів з нормальною масою тіла за наявності абдомінального ожиріння розвивається інсулінорезистентність, що, ймовірно, пов'язано з вісцеральною жировою тканиною. Пацієнти з нормальним індексом маси тіла (ІМТ), як і ті, хто має високі значення цього показника, можуть мати підвищену кількість вісцерального жиру [6].

Незважаючи на високу поширеність НАЖХП та її потенційні ускладнення, основні етіологічні чинники, які визначають розвиток та прогресування захворювання, залишаються остаточно нез'ясованими [1, 7, 9, 11]. Відомо, що однією з патогенетичних ланок формування та прогресування НАЖХП є порушення розподілу та дисфункція жирової тканини, яка продукує адипокіні [8]. Адипоцитокіні залучені до патогенезу НАЖХП завдяки їх прозапальній та метаболічній активності. За даними літератури, існують кількісні та якісні відмінності між метаболічно активними субстратами, які синтезуються різними видами жирової тканини. Невелика кількість публікацій присвячена оцінці рівня адипоцитокінів залежно від характеру жиророзподілу, зокрема у пацієнтів НАЖХП.

Не викликає сумніву той факт, що існують генетичні передумови до розвитку НАЖХП. На цей час обговорюється роль кількох генів, які здатні впливати на вуглеводний, ліпідний обмін та стан вісцеральної жирової тканини. ADIPOR1 є рецептором для глобулярного адипонектину, експресується переважно в скелетній мускулатурі [10, 12]. ADIPOR1 опосередковує ефекти адипонектину на тканини та асоційовані з ризиком розвитку цукрового діабету (ЦД) 2 типу [13]. В дослідженнях варіацій генів ADIPOR1 та ADIPOR2 отримано суперечливі результати в різних популяціях.

Мета дослідження — оцінка наявності зв'язку між рівнем адипонектину, вісцеральної жирової тканини і поліморфним геном ADIPOR1 у пацієнтів з НАЖХП.

Роботу виконано в рамках науково-дослідної роботи відділу захворювань печінки і шлунково-кишкового тракту ДУ «Інститут терапії ім. Л.Т. Малої НАМН України» «Розробка способів виявлення та профілактики неалкогольної жирової хвороби печінки на основі вивчення клінічних, фенотипових особливостей у пацієнтів з метаболічним синдромом» (номер державної реєстрації 0110U002879).

Матеріали та методи

Об'єктом дослідження були 112 хворих на неалкогольний стеатоз печінки на тлі метаболічного синдрому (МС), які перебували на стаціонарному лікуванні в гастроентерологічному відділенні ДУ «Інститут терапії ім. Л.Т. Малої НАМН України». Діагноз верифіковано клініко-інструментальними методами дослідження.

До групи обстеження включили пацієнтів з ознаками МС згідно з рекомендаціями International Diabetes Federation (2005): центральне (абдомінальне) ожиріння (обвід талії понад 94 см для чоловіків і понад 80 см для жінок) у поєднанні як мінімум з двома з наступних 4 чинників: підвищення рівня тригліцеридів (ТГ) понад 1,7 ммоль/л або специфічне лікування дисліпідемії; зниження вмісту ліпопротеїдів високої щільності (ЛПВЩ) менше ніж 1,03 ммоль/л у чоловіків і менше ніж 1,29 ммоль/л у жінок або специфічне лікування; підвищення АТ: систолічного (САТ) — понад 130 мм рт. ст. або діастолічного (ДАТ) понад 85 мм рт. ст. або антигіпертензивна терапія; підвищення рівня глюкози у венозній плазмі натще понад 5,6 ммоль/л або раніше виявлений ЦД 2 типу.

Обстежені хворі не зловживали алкоголем (споживання < 50 г етанолу/тиж для чоловіків, < 30 г етанолу/тиж для жінок протягом останнього року); не мали ознак хронічного вірусного гепатиту, асоційованого з HBV-, HCV-, HDV-інфекцією; автоімунного та медикаментозного гепатиту. До групи обстеження не включали пацієнтів з хворобою Коновалова — Вільсона, ідіопатичним гемохроматозом, вродженою недостатністю α_1 -антитрипсину.

Контрольну групу склали 30 здорових осіб. Групи були порівнянні за віковим та статевим розподілом.

Середній вік обстежених хворих НАЖХП на тлі МС становив ($40,8 \pm 2,7$) року. Тривалість НАЖХП — від 2 до 10 років.

Методом імуноферментного аналізу на імуноферментному фотометрі-аналізаторі Human-

reader з набором реагентів Jrgenium Laboratories Anti Biotech Oy (Фінляндія) визначали рівень адипонектину у сироватці крові.

Усім пацієнтам, включеним у дослідження, на підставі проведеної комп'ютерної томографії встановлено діагноз «стеатоз печінки» за критеріями, запропонованими В. Birnbaum та співавт. (2007).

Для визначення зони розташування абдомінальної вісцеральної (ВЖТ) та підшкірної жирової тканини (ПЖТ), співвідношення ВЖТ/ПЖТ використовували дані сканограм, отриманих при проведенні комп'ютерної томографії за допомогою комп'ютерного томографа HiSpeed CT/e Dual General Electric на рівні пупка.

Молекулярно-генетичне тестування ДНК виконували методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Геномну ДНК виділяли з лімфоцитів периферичної крові за стандартним протоколом з використанням набору реагентів DIAAtom DNA Prep Prep 200 (ТОВ «Лабораторія ІзоГен»). Цей метод є одним з найефективніших для виділення ДНК з мінімальною тривалістю екстрагування, не поступається, а в низці випадків — перевершує зарубіжні аналоги, за своїми характеристиками призначений для виділення ДНК з різних біологічних матеріалів (рідин, подрібнених твердих матеріалів, плям крові тощо), а також для швидкого очищення ДНК з клінічних проб (цільної крові, плазми, сироватки, сечі, зішкребків слизової оболонки тощо). Вихід чистої ДНК з цільної крові становить 5–10 мкг з 200 мкл крові.

Принцип дії набору «DIAAtom DNA Prep» ґрунтується на використанні лізуючого агента з гуанідинтіоціанатом, який призначений для руйнування клітин, сольобілізації клітинного дебриса, денатурації клітинних нуклеаз. За наявності лізуючого реагенту ДНК активно сорбується на NucleoS сорбенті, а потім легко відмивається від солей і білків спиртовим розчином. ДНК, елюйовану із сорбенту «Екстра-Геном» або чистою водою, можна досліджувати різними методами.

Методичною основою генотипування була тетрапраймерна ПЛР з використанням двох внутрішніх алей-специфічних праймерів: AD16666089S337 5'-ATGAAATAGTATTATTT-TATTCSS-3', AD16666089S167 5'-ATAATTAC-STCATCTGAAAAGTA-3' і двох зовнішніх праймерів: AD16666089F 5'-ACCTCAATATGGCTGTAACTCC-3', AD16666089R 5'-CTGAGGGTTTTATACAAATGG-3'. Метод дає змогу ампліфікувати фрагменти ДНК різної довжини, які відповідають альтернативним аелям. Кожен зовнішній праймер у поєднанні з відповідним йому внутрішнім праймером ініціює ампліфікацію алей-специфічних фрагментів (337 пар нуклеотидів (п. н.) — норма і 167 п. н. — мутація).

Дизайн олігонуклеотидних праймерів для проведення ПЛР здійснювали за допомогою програми Vector NTI (Invitrogen) та інформаційного ресурсу NCBI.

У цій роботі ПЛР послідовності гена ADIPOR1 rs666089 проводили в автоматичному режимі на термоциклерах «Терцік» («ДНК-технологія»), GeneAmp 9700 з 96-комірчастим блоком (Applied Biosystems) з використанням комерційного набору реактивів GenePak PCR Core «Ізоген» відповідно до протоколу фірми-виробника.

Температурно-часовий режим ПЛР оптимізовано для ампліфікації даної нуклеотидної послідовності: ініціація денатурації — 95 °С, 2 хв, 1 цикл; денатурація — 95 °С, 30 с; отжиг праймерів — 56 °С, 15 с, 40 циклів; елонгація — 74 °С, 30 с; завершальна елонгація — 74 °С, 2 хв, 1 цикл.

Детекцію ПЛР-продуктів проводили за допомогою горизонтального електрофорезу в пластині 2,5 % агарозного гелю з додаванням бромистого етидію (специфічного інтеркалюючого флуоресцентного ДНК (РНК)-барвника), використанням стандартного трис-боратного буфера за напруги поля ~20 В/см протягом 30 хв. Поглинаючи ультрафіолетове світло з максимальною довжиною хвилі 256 нм, бромід етидію, пов'язаний з ділянкою ДНК (амплікон), здатний відповідно до правила Стокса флуоресціювати, що реєструється у видимому спектрі (610–620 нм) у вигляді помаранчевої смужки. Одержані результати електрофорезу оцінювали в прохідному ультрафіолетовому світлі на транслюмінаторі TFP-M/WL (VILBER LOURMAT). Фіксування результатів проводили за допомогою стандартної гелі-документуючої системи з використанням програмного забезпечення Vitran Photo.

Статистичну обробку даних виконували за допомогою пакета статистичних програм Statistica 6.0. Обчислення середньої величини (M), середньої похибки середньої величини (m), критерію вірогідності (t), значення вірогідності (p) здійснювали для незалежних вибірок при порівнянні вихідних даних, при аналізі динаміки

досліджуваних показників — з використанням t-критерію для зв'язаних вибірок.

Результати та обговорення

У хворих на НАЖХП виявили вірогідне зниження рівня адипонектину порівняно з контрольною групою, підвищення площі вісцеральної жирової тканини (табл. 1).

Визначені відхилення мали гендерні особливості: у чоловіків рівень адипонектину був вірогідно зниженим порівняно з жінками ($p < 0,05$), а площа ВЖТ — більшою. ПЖТ також була більшою в групі хворих на НАЖХП, у чоловіків більшою, ніж у жінок. Гендерних відмінностей у величині відношення ВЖТ/ПЖТ не виявлено.

Проаналізовано вміст адипонектину, площу ВЖТ, ПЖТ та співвідношення ВЖТ/ПЖТ залежно від варіанта поліморфного гена ADIPOR1 (табл. 2). Низький вміст адипонектину виявлено у хворих НАЖХП з GG-генотипом ($p < 0,05$). ВЖТ була значно більш розвиненою у хворих з наявністю алеля G. У гомозигот за алелем G її площа була найбільшою порівняно з гетерозиготами та гомозиготами за алелем A ($p < 0,05$). Відповідну тенденцію спостерігали для ПЖТ. Відношення ВЖТ/ПЖТ було вірогідно вищим у носіїв алеля G. Вірогідної різниці за цим показником між хворими на НАЖХП гомозиготами за алелем A та групою контролю не виявлено. Відношення ВЖТ/ПЖТ було більшим у хворих-носіїв генотипу GG порівняно з носіями генотипу AA ($p < 0,05$). Вірогідної різниці за цим показником між гомозиготами GG та гетерозиготами GA не виявлено.

Ураховуючи виявлені порушення розподілу жирової тканини у хворих на НАЖХП, проаналізовано кількість хворих з надлишком ВЖТ (ВЖТ ≥ 90 см²). У групі контролю особи з надлишком ВЖТ були відсутні (табл. 3). Проте серед хворих з НАЖХП, які були носіями генотипу GG, частка хворих, у яких площа ВЖТ перевищувала 90 см², була максимальною (91,4 %). У гетерозигот та гомозигот за алелем A цей показ-

Таблиця 1. Вміст адипонектину, площа жирової тканини залежно від статі у хворих на НАЖХП (M \pm m)

Показник	Група контролю	Хворі на НАЖХП		
		Чоловіки (n = 68)	Жінки (n = 44)	Усього (n = 112)
Адипонектин, нг/мл	10,49 \pm 0,41	6,34 \pm 0,42	7,42 \pm 0,36*	6,87 \pm 0,38
ВЖТ, см ²	52,18 \pm 09,30	171,3 \pm 27,10	114,1 \pm 12,71*	152,2 \pm 35,2
ПЖТ, см ²	98,1 \pm 07,18	226,20 \pm 48,41	169,04 \pm 31,27*	228,5 \pm 61,2
ВЖТ/ПЖТ	0,53 \pm 0,02	0,76 \pm 0,07	0,67 \pm 0,04	0,66 \pm 0,39

Примітка. * Різниця щодо показників чоловіків статистично значуща ($p < 0,05$).

Таблиця 2. Вміст адипонектину, площа жирової тканини у хворих на НАЖХП залежно від генотипу поліморфного гена ADIPOR1

Показник	Група контролю	Хворі на НАЖХП		
		AA (n = 16)	GA (n = 52)	GG (n = 44)
Адипонектин, нг/мл	10,49 ± 0,41	8,32 ± 0,56*	6,28 ± 0,54**	5,06 ± 0,24***
ВЖТ, см ²	52,18 ± 09,30	72,18 ± 11,20*	148,21 ± 05,13**	221,24 ± 09,12***
ПЖТ, см ²	98,1 ± 07,18	122,40 ± 18,10*	219,10 ± 31,82**	321,14 ± 51,71***
ВЖТ/ПЖТ	0,53 ± 0,02	0,58 ± 0,05	0,68 ± 0,023**	0,69 ± 0,011**

Примітка. * Різниця щодо показників контрольної групи статистично значуща (p < 0,05).

** Різниця щодо показників хворих — носіїв генотипу AA статистично значуща (p < 0,05).

*** Різниця щодо показників хворих — носіїв генотипу GA статистично значуща (p < 0,05).

Таблиця 3. Частка хворих з надлишком ВЖТ залежно від генотипу ADIPOR1

Показник	Група контролю	Хворі на НАЖХП		
		AA (n = 16)	GA (n = 52)	GG (n = 44)
ВЖТ < 90 см ²	30 (100 %)	37,5 % *	11,4 %**	8,6 %**
ВЖТ ≥ 90 см ²	0	62,5 % *	88,6 %**	91,4 %**

Примітка. * Різниця щодо показників контрольної групи статистично значуща (p < 0,05).

** Різниця щодо показників хворих — носіїв генотипу AA статистично значуща (p < 0,05).

ник становив відповідно 88,6 та 62,5. Отримані дані демонструють несприятливий вплив алеля G поліморфного гена ADIPOR1 на розподіл жирової тканини та перебіг НАЖХП, а також підтверджують патогенетичну роль вісцеральної жирової тканини у формуванні та розвитку НАЖХП, яка генетично детермінована.

При аналізі рівня адипонектину залежно від площі ВЖТ виявили вірогідне зниження його вмісту у хворих з ВЖТ ≥ 90 см² (p < 0,05), а при аналізі цього показника залежно від відношення ВЖТ/ПЖТ — вірогідну гіпоадипонектиемію у хворих з ВЖТ/ПЖТ ≥ 0,65 (p < 0,05).

На нашу думку, гіпоадипонектиемія, з одного боку, створює передумови для дисфункції жирової тканини і негативно впливає на характер жиророзподілу у пацієнтів з НАЖХП, а з другого — зростання площі ВЖТ збільшує частоту формування «жирної» печінки. Це призводить до формування певного «метаболічного» фенотипу пацієнта з НАЖХП завдяки ефектам рецепторів адипонектину.

Отримані дані узгоджуються з результатами дослідження О.Т. Ayonrinde, в якому виявлено наявність гендерних особливостей у перебігу НАЖХП, пов'язаних з розподілом жирової тканини та синтезом адипоцитокінів. Чоловічий фенотип асоціювався з несприятливішими метаболічними особливостями [2]. За даними Р.Н. Ducruzeau, у хворих на неалкогольний стеатоз встановлено взаємозв'язок між об'ємом вісце-

ральної жирової тканини та її частки і вмістом жиру у печінці [3]. Результати досліджень Y. Eguchi продемонстрували наявність тісних взаємозв'язків між накопиченням вісцерального жиру, формуванням стеатозу та розвитком НАЖХП [4].

У нашому дослідженні у хворих НАЖХП встановлено зміну площі вісцеральної жирової тканини та рівня адипонектину залежно від поліморфізму гена ADIPOR1. Отримані дані підтверджують важливу роль ADIPOR1 у розвитку НАЖХП та генетичну мінливість у локусі ADIPOR1. Остання детермінує метаболічні порушення, які змінюють ефекти адипонектину та його рецепторів у печінці, що призводить до надмірного розвитку жирової тканини, змінює її розподіл і може спричинити тяжчий перебіг НАЖХП.

Висновки

У хворих на НАЖХП зміни рівня адипонектину і площі вісцеральної жирової тканини залежать від поліморфізму гена ADIPOR1.

У хворих на НАЖХП, які мають генотип GG поліморфного гена ADIPOR1, порівняно з носіями генотипів GA та AA, виявлено порушення розподілу жирової тканини, про що свідчить вірогідне підвищення площі ВЖТ і ПЖТ, величини співвідношення ВЖТ/ПЖТ (p < 0,05).

Хворих на НАЖХП, які є гомозиготами за алелем G, рівень адипонектину суттєво знижений порівняно з гетерозиготами та гомозиготами за алелем A (p < 0,05).

Провідну роль у формуванні НАЖХП відіграє рівень адипонектину та надмірний розвиток вісцеральної жирової тканини. На зміни цих показників суттєво впливає генетичний чинник, а саме наявність алеля G у поліморфному гені ADIPOR1.

Перспективи подальших досліджень у цьому напрямі полягають у вивченні ролі генів, які відповідають за розвиток НАЖХП, на вибірці більшого розміру, їхнього зв'язку з метаболічними параметрами, що дасть змогу уточнити роль генів, зокрема ADIPOR1, у формуванні НАЖХП.

Список літератури

1. Abdelmalek M.F. et al. Increased fructose consumption is associated with fibrosis severity in patients with non alcoholic fatty liver disease // *Hepatology*.— 2010.— Vol. 51.— P. 1961—1971.
2. Ayonrinde O.T. et al. Gender-specific differences in adipose distribution and adipocytokines influence adolescent nonalcoholic fatty liver disease // *Hepatology*.— 2011.— Vol. 53 (3).— P. 800—809.
3. Ducluzeau P.H. et al. Distribution of abdominal adipose tissue as a predictor of hepatic steatosis assessed by MRI // *Clin. Radiol.*— 2010.— Vol. 65.— P. 695—700.
4. Eguchi Y. et al. The pathological role of visceral fat accumulation in steatosis, inflammation, and progression of nonalcoholic fatty liver disease // *J. Gastroenterol.*— 2011.— Suppl. 1.— P. 70—78.
5. Fabbrini E., Sullivan S., Klein S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications // *Hepatology*.— 2010.— Vol. 51.— P. 679—689.
6. Mirza M. S. et al. Obesity, visceral fat, and NAFLD: Querying the role of adipokines in the progression of nonalcoholic fatty liver disease // *Gastroenterol.*— 2011.— Vol. 2011.— P. 592—604.
7. Obstfeld A.E. et al. C-C chemokine receptor 2 (CCR2) regulates the hepatic recruitment of myeloid cells that promote obesity-induced hepatic steatosis // *Diabetes*.— 2010.— Vol. 59.— P. 916—925.
8. Ohashi K. et al. Adiponectin promotes macrophage polarization toward an anti-inflammatory phenotype // *J. Biol. Chem.*— 2010.— Vol. 285.— P. 6153—6160.
9. Tiniakos D.G., Vos M.B., Brunt E.M. Nonalcoholic fatty liver disease: pathology and pathogenesis // *Ann. Rev. Pathol.*— 2010.— Vol. 5.— P. 145—171.
10. Tokushige K. et al. Influence of adiponectin gene polymorphisms in Japanese patients with non-alcoholic fatty liver disease // *J. Gastroenterol.*— 2009.— Vol. 44.— P. 976—982.
11. Unger R.H., Scherer P.E. Gluttony, sloth and the metabolic syndrome: a roadmap to lipotoxicity // *Trends Endocrinol. Metab.*— 2010.— Vol. 21.— P. 345—352.
12. Uribe M. et al. Hepatic expression of ghrelin and adiponectin and their receptors in patients with nonalcoholic fatty liver disease // *Ann. Hepatol.*— 2008.— Vol. 7 (1).— P. 67—71.
13. Yeh E. et al. Association of polymorphisms at the ADIPOR1 regulatory region with type 2 diabetes and body mass index in a Brazilian population with European or African ancestry // *Braz. J. Med. Biol. Research.*— 2008.— Vol. 41.— P. 468—472.

О.Я. Бабак, Е.В. Колесникова, И.В. Шуть

Взаимосвязь между содержанием адипонектина, висцерального жира и полиморфным геном ADIPOR1 у больных неалкогольной жировой болезнью печени

Представлены результаты исследования, которые свидетельствуют о ведущей роли гипoadипонектинемии и чрезмерного развития висцеральной жировой ткани (ВЖТ) в формировании неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП). Изменения этих показателей зависят от наличия аллеля G в полиморфном гене ADIPOR1. Показано, что больные НАЖБП, носители GG-генотипа, по сравнению с носителями генотипов GA и AA, имеют достоверно более высокие показатели площади ВЖТ, ПЖТ, величины соотношения ВЖТ/ПЖТ. У больных НАЖБП, которые являются гомозиготами по G-аллелю, существенно снижен уровень адипонектина по сравнению с гетерозиготами и гомозиготами AA. Полученные данные подтверждают влияние генетических факторов на развитие НАЖБП.

O.Ya. Babak, O.V. Kolesnikova, I.V. Shut

Relationship of adiponectin levels, visceral fat and ADIPOR1 gene polymorphisms in patients with non-alcoholic fatty liver disease

The article presents the results of studies that suggest the leading role of hypoadiponectinemia and excessive development of visceral adipose tissue (VAT) in the formation of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). Changes in these parameters depend on the presence of G allele in polymorphic gene ADIPOR1. It has been shown that NAFLD patients, carriers of GG genotype, compared with genotype GA and AA, have significantly higher rates of VAT, SAT, VAT/SAT. In patients with NAFLD, which were homozygous for the G allele, adiponectin levels were significantly reduced compared to heterozygous and homozygous AA. The obtained results confirm the influence of genetic factors on NAFLD development.

Контактна інформація

Бабак Олег Якович, д. мед. н., проф.
61039, м. Харків, вул. Постишева, 2а
Тел. (57) 370-20-24. E-mail: info@therapy.gov.ua

Стаття надійшла до редакції 23 жовтня 2012 р.