

Г.Ю.Бабаджанова

Исследование полиморфизма некоторых известных генов классического сахарного диабета типа 2 у больных бронхиальной астмой с индуцированным стероидами сахарным диабетом

ФГУ НИИ пульмонологии Росздрава, г. Москва

G. Yu. Babadzhanova

Investigation of some known type 2 diabetes mellitus gene polymorphism in asthma patients with steroid-induced diabetes

Summary

Different associations between type 2 diabetes occurrence and genetic factors are reported in different European countries. The aim of our work was to investigate whether XbaI polymorphism of skeletal muscle glycogen synthase gene GYS1 and BstEII polymorphism of glucagon receptor gene GCG-R could be markers of type 2 diabetes in Russian population. We examined 150 patients, 75 of them had family history of diabetes and 75 did not. Asthma patients with steroid-induced diabetes were in the group with family history of diabetes. The control group included 109 healthy subjects not having family susceptibility for diabetes. All the participants were residents of Moscow or Moscow region. The patients' age was 20 to 68 yrs, the age of diabetes onset was 48.5 ± 8.2 yrs, body mass index (BMI) was 27.3 ± 2.1 kg/m². The controls' age was 36.1 ± 13.9 yrs, IMT was 25.6 ± 3.8 kg/m². To investigate the gene polymorphism, we used genomic DNA of blood leukocytes. The GYS1 gene presented in 2 alleles: A1 (without XbaI site) and A2 (with XbaI site). When this polymorphism presented, the restrictive BstEII site of GCG-R gene was not found. Polymorphism XbaI of GYS gene was revealed in 16 IID patients (6 with family history and 10 without that) and in 17 (15.6 %) controls. All type 2 diabetes patients with A2 allele had elder age of diabetes onset ($p = 0.001$). Therefore, any correlation between A2 allele and type 2 diabetes was not found in Russian population and XbaI polymorphism of GYS gene can not be considered as a marker of type 2 diabetes in Russian patients. The Gly40Ser mutation of GCG-R gene was not also found in Russian population. This demonstrates no correlation between this mutation and genetic susceptibility for type 2 diabetes in Russian population. Reason for such results could be multifactorial nature of type 2 diabetes and different role of genetic and environmental factors in different patient populations.

Резюме

В разных странах Европы получены разные ассоциации между развитием инсулин-независимого сахарного диабета (СД 2-го типа) и генетическими факторами. Целью настоящей работы было исследовать, являются ли XbaI-полиморфизм гена гликогенсинтазы скелетной мышцы GYS1 и BstEII-полиморфизм гена рецептора глюкагона GCG-R маркерами СД в популяции Российской Федерации. Обследованы 150 пациентов с СД 2-го типа, из них 75 с отягощенным СД по семейным анамнезом, 75 — без отягощенного семейного анамнеза. Среди отягощенных больных находились пациенты с БА с сопутствующим индуцированным стероидами СД. Контрольную группу составили 109 здоровых лиц без наследственной отягощенности по СД. Все участники исследования проживали в Москве или Московской области. Возраст пациентов составил от 20 до 68 лет, возраст манифестации диабета — $48,5 \pm 8,2$ года, индекс массы тела (ИМТ) — $27,3 \pm 2,1$ кг/м². Возраст контрольной группы составил $36,1 \pm 13,9$ года, ИМТ — $25,6 \pm 3,8$ кг/м². Для выявления полиморфизма соответствующих генов использована геномная ДНК лейкоцитов периферической крови. Результатом исследования гена GYS1 явилось присутствие двух аллелей — A1 (без сайта XbaI) и A2 (с сайтом XbaI). При наличии данного полиморфизма рестрикционный сайт BstEII гена GCG-R отсутствовал. Полиморфизм XbaI гена GYS был обнаружен у 16 (6 с семейным анамнезом и 10 без него) пациентов с СД 2-го типа (10,7 %) и у 17 из 109 контрольных лиц (15,6 %). Все пациенты СД 2-го типа с аллелью A2 имели более поздний возраст манифестации СД ($p = 0,001$). Таким образом, в российской популяции не обнаружено ассоциаций между аллелью A2 и СД 2 типа, следовательно, XbaI-полиморфизм гена GYS в российской популяции не может рассматриваться в качестве маркера СД 2-го типа. Мутация Gly40Ser гена GCG-R не была выявлена среди пациентов российской популяции, что свидетельствует об отсутствии связи данной мутации с генетической предрасположенностью к СД 2-го типа в российской популяции. Одной из причин таких результатов может служить мультифакториальная природа СД 2-го типа, а также различная роль генетических факторов и факторов окружающей среды в разных популяциях.

Известно, что генетические факторы вносят определенный вклад в развитие инсулин-независимого сахарного диабета (СД 2-го типа), а гены, принимающие участие в регулировании функций β -клеток поджелудочной железы и эффектах инсулина, являются кандидатными для СД 2-го типа. Однако тестирование кандидатных генов на предмет связи с СД 2-го типа зависит от идентификации высоко инфор-

мативных полиморфизмов ДНК на локусе кандидного гена или вблизи этого локуса. Ген гликоген синтазы (GYS) является первым кандидатным геном для генетической мутации СД 2-го типа. Сфокусированный на гене гликоген синтазы интересен с точки зрения возможной мутации: при СД 2-го типа были обнаружены дефекты в синтезе и активации соответствующего энзима [1, 2]. Известны две гликоген

синтазы, закодированные различными генами: гликоген синтаза скелетной мышцы (GYS1) и гликоген синтаза печени (GYS2). Ген изоэнзима гликоген синтазы печени человека расположен на коротком плече хромосомы 12 [3]. Исследования сиблинговых пар с использованием простого полиморфизма последовательно-повторяющейся ДНК, физически связанного с геном полипептида амилоида островка и геном печеночной гликоген синтазы, не подтвердили наличие связи с СД 2-го типа, показав, что они не являются основными генами, вносящими вклад в развитие СД 2-го типа [4]. Гликоген синтаза скелетной мышцы, расположенная на хромосоме 19q13.3, является энзимом, играющим важную роль во взаимодействии глюкозы и инсулина при неоксидативном пути. Независимые исследования показали наличие ассоциации гена гликоген синтазы скелетной мышцы с СД 2-го типа в финской [5] и японской [6] популяциях и у индейцев пима [7]. В работе *L.C.Groop et al.* [5] сообщается, что полиморфизм XbaI гена GYS1 ассоциируется с высоким риском развития инсулинорезистентности и СД 2-го типа в финской популяции. Данный полиморфизм ДНК (A2 аллель) позволяет выделить подгруппу пациентов с СД 2-го типа, характеризующуюся строгой семейной историей СД 2-го типа, высокой предрасположенностью к гипертонии и значительной инсулинорезистентностью. Однако в противоположность результатам, полученным в Финляндии, ассоциации A2 аллели с СД 2-го типа в популяциях Франции и Японии [8, 9] найдены не были.

Вторым кандидатным геном, исследованным в нашей популяции, был ген рецептора глюкагона, обозначаемый GCG-R. Ассоциация и связь между СД 2-го типа и мутацией в GCG-R, возникающей в результате замены аминокислоты глицина (Gly) на серин (Ser) на кодоне 40, обозначаемой (Gly40Ser), были впервые обнаружены во французской популяции, охватившей обследованием 216 пациентов с СД 2-го типа и MODY-типом диабета во Франции и 96 пациентов с СД 2-го типа — жителей острова Сардиния [10]. Все пациенты с СД 2-го типа имели поздний возраст манифестации диабета. Частота этой мутации составила 4,6 % среди французских пациентов с семейными формами СД, а в рандомизированной выборке пациентов с СД 2-го типа из Сардинии она составила 8,3 %, причем оказалась достоверно выше, чем в контрольной группе. Данная мутация гена GCG-R изучалась также в трех географических регионах Великобритании у больных СД 2-го типа (всего 691 человек) и была обнаружена у 15 человек, что составило 2,2 % случаев. Кроме этого, она изучалась у пациентов с СД 1-го типа в этой же популяции (всего 404 человека из сиблинговых пар) и была обнаружена у 10 из них, что составило 2,5 % [11]. Позже эта мутация изучалась и в других популяциях, при этом она присутствовала не во всех из них.

В связи с тем, что результаты в изучаемых популяциях оказались противоречивы, а также учитывая

гетерогенность СД 2-го типа в разных этнических группах, нами была поставлена задача исследования наличия полиморфизмов гена гликоген синтазы и гена рецептора глюкагона (его мутации) и их ассоциации с диабетом в российской популяции. Учитывая частую семейную отягощенность в семьях с СД 2-го типа в российской популяции, наличие метаболических нарушений и гипертонии, мы сочли важным изучить распространенность GYS полиморфизма в наших семьях. Учитывая также роль глюкагона в контроле процессов продукции глюкозы печенью и, таким образом, регуляции секреции инсулина, а также его эффекты, осуществляемые посредством связи с собственным трансмембранным рецептором, мы не исключали вероятное участие гена рецептора глюкагона GCG-R в развитии диабета у наших пациентов. В связи с этим в исследование были включены пациенты с СД 2-го типа, пациенты с бронхиальной астмой (БА) с сопутствующим индуцированным стероидами СД 2-го типа (ИССД) и контрольная группа.

Целью настоящей работы было исследовать, являются ли XbaI-полиморфизм гена GYS1 и BstEII-полиморфизм гена GCG-R маркерами СД в популяции РФ.

Материалы и методы

Исследуемые группы состояли из 150 пациентов с СД 2-го типа, из них 75 с отягощенным семейным анамнезом по СД (по крайней мере, 2 члена семьи), 75 без отягощенного семейного анамнеза. Среди отягощенных больных находились пациенты с БА с сопутствующим ИССД. Контрольную группу составили 109 здоровых лиц без наследственной отягощенности по диабету. Диабет диагностирован в соответствии с критериями ВОЗ. Все лица не являлись родственниками и проживали в г. Москве или Московской области.

Возраст пациентов составил от 20 до 68 лет, возраст манифестации диабета — $48,5 \pm 8,2$, индекс массы тела — $27,3 \pm 2,1$ кг/м². Возраст лиц контрольной группы составил $36,1 \pm 13,9$ лет, индекс массы тела — $25,6 \pm 3,8$ кг/м². Все они имели нормальную толерантность к глюкозе. Ни одна из контрольных персон не имела хронической патологии и не находилась постоянно на какой-либо терапии. Все пациенты находились на диете и / или принимали перорально сахароснижающие препараты.

Геномная ДНК была экстрагирована из лейкоцитов периферической крови, фотометрически измерена и использована для установления наличия XbaI-полиморфизма и BstEII-полиморфизма соответствующих генов. Полученная ДНК была амплифицирована посредством проведения полимеразной цепной реакции (PCR), полученный амплификант был обработан соответствующими энзимами для проведения и анализа следующего исследования:

определения длины полиморфизма рестрикционно-го фрагмента с использованием 2%-ного агарозного геля, содержащего этидиум бромид. Все полученные фрагменты анализировались нами в ультрафиолетовых лучах.

Результатом исследования гена гликоген синтазы явилось присутствие двух аллелей — A1 и A2, которые определялись следующим образом: аллель A1 не содержала сайт XbaI, аллель A2 — сайт XbaI.

Что касается второго исследования гена рецептора глюкагона, то в присутствии данного полиморфизма рестрикционный сайт BstEII отсутствовал.

Таким образом, аллель данного полиморфизма соответствовала длине 196 базовой пары.

Для установления сигнификантности в различии частоты использовался критерий χ^2 .

Результаты и обсуждение

Полиморфизм XbaI гена GYS, представленный на аллеле A2, был обнаружен у 16 (6 с семейной историей и 10 без нее) из 150 пациентов с СД 2-го типа (10,7 %) и у 17 из 109 лиц здорового контроля (15,6 %). Все пациенты СД 2-го типа с аллелью A2 имели достоверно более поздний возраст манифестации СД ($p = 0,001$). Молодой возраст лиц контрольной группы не может повлиять на результаты значительным образом, поскольку кумулятивный риск заболеваемости (популяционный риск развития диабета для каждого рожденного индивидуума) СД 2-го типа к возрасту 40 лет составляет 0,1 % у мужчин и 0,15 % у женщин в популяции г. Москвы и Московской области [12].

Таким образом, в противоположность результатам, полученным в финской популяции [5], где аллель A2 была обнаружена у 30 % пациентов с СД 2-го типа и 8 % лиц здорового контроля, и в соответствии с результатами, полученными в японской [6] (9 % пациентов с СД 2-го типа и 9 % лиц здорового контроля) и французской [8] (4 % пациентов с СД 2-го типа и 12 % лиц здорового контроля) популяциях, в российской популяции не было обнаружено ассоциаций между аллелью A2 и СД 2-го типа. Таким образом, XbaI-полиморфизм гена GYS не может рассматриваться в качестве маркера СД 2-го типа в российской популяции.

Что касается гена рецептора глюкагона GCG-R, все исследованные нами пациенты оказались гомозиготами по аллели дикого типа, что соответствует тому, что мутация гена GCG-R (Gly40Ser) не была выявлена среди пациентов российской популяции. Только двое лиц контрольной группы (причем оба при проведении ОГТТ имели уровни глюкозы в крови через 2 часа, равные $5,1 \pm 0,2$ ммоль/л, и у обоих отсутствовала семейная отягощенность по СД 2-го типа) оказались гетерозиготными носителями данного полиморфизма.

Таким образом, в противоположность результатам, полученным в популяциях Франции и Сардинии [10] и популяции Великобритании [11], и в соответствии с результатами, полученными в популяциях Японии [13], Финляндии [14], Нидерландов [15] и Германии [16], ни у одного из пациентов, принявших участие в нашем исследовании, не была обнаружена мутация гена GCG-R (Gly40Ser).

Отсутствие мутации гена GCG-R у 150 российских пациентов с СД 2-го типа и ее присутствие только у двоих здоровых лиц ясно показывает, что данная мутация не связана с генетической предрасположенностью к СД 2-го типа в российской популяции GCG-R (Gly40Ser).

Причины различной частоты встречаемости мутаций гена гликоген синтазы и гена рецептора глюкагона в различных популяциях, которые приведены в настоящей работе, пока не совсем ясны. Тем не менее одним из объяснений этих различий может послужить мультифакториальная природа самого заболевания, а также различия во вкладе генетических факторов и факторов окружающей среды в различных популяциях.

Исследованные нами гены позволили сузить круг изучаемых многочисленных генов-кандидатов, участвующих в возникновении и развитии СД 2-го типа.

Литература

1. Vestergaard H., Bjoerbaek C., Andersen P.H. et al. Impaired expression of glycogen synthase mRNA in skeletal muscle of NIDDM patients. *Diabetes* 1991; 40: 1740–1745.
2. Thoburn A.W., Gumbiner B., Bulacan F. et al. Multiple defects in muscle glycogen synthase activity contribute to reduced glycogen synthesis in non-insulin dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* 1991; 87: 489–495.
3. Nutall F.Q., Gannon M.C., Kubie V.L. et al. The human liver glycogen synthase isozyme gene is located on the short arm of chromosome 12. *Genomics* 1994; 19: 404–405.
4. Gambino V., Menzel S., Trabb J.B. et al. An approach for identifying simple sequence repeat DNA polymorphisms near cloned cDNAs and genes. Linkage studies of the islet amyloid polypeptide/amylin and liver glycogen synthase genes and NIDDM. *Diabetes* 1996; 45: 291–294.
5. Groop L.C., Kankuri M., Schalin-Jantti C. et al. Association between polymorphism of the glycogen synthase gene and non-insulin dependent diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 1993; 328: 10–14.
6. Kuroyama H., Sanke T., Ohagi S. et al. Simple tandem repeat DNA polymorphism in the human glycogen synthase gene is associated with NIDDM in Japanese subjects. *Diabetologia* 1993; 37: 536–539.
7. Majer M., Mott D.M., Mochisuki H. et al. Association of the glycogen synthase locus on 19q13 with NIDDM in Pima Indians. *Diabetologia* 1996; 39: 314–321.
8. Zouali H., Velho G., Froguel P. Polymorphism of the glycogen synthase gene and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 1993; 328: 1568.
9. Kadowaki T., Kadowaki H., Yazaki Y. Polymorphism of the glycogen synthase gene and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 1993; 328: 1568–1569.

10. *Hager J., Hanson L., Vaisse C. et al.* A missense mutation in the glucagon receptor gene and is associated with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Nat. Genet.* 1995; 9: 299–304.
11. *Gough S.C.L., Saker P.J., Pritchard L.E. et al.* Mutation of the glucagon receptor gene and diabetes mellitus in the UK: association or founder effect? *Hum. Mol. Genet.* 1995; 4: 1609–1612.
12. *Babadjanova G., Sergeyev A., Kuraeva T. et al.* Genetic analysis of the structure of liability to diabetes mellitus. IV. Population-genetical study of two types of diabetes mellitus beginning at the age of 20–40 yrs old. *Genetica* 1990; 26: 2051–2057.
13. *Fujisawa T., Ikegami H., Yamoto E. et al.* A mutation in the glucagon receptor gene (Gly40Ser): heterogeneity in the association with diabetes mellitus. *Diabetologia* 1995; 38: 983–985.
14. *Huang X., Orho M., Lehto M. et al.* Lack of association between the Gly40Ser polymorphism in the glucagon receptor gene and NIDDM in Finland. *Diabetologia* 1995; 38: 1246–1248.
15. *Hart L.M., Stolk R.P., Jansen J.J. et al.* Absence of the Gly40Ser mutation in the glucagon receptor among diabetes patients in the Netherlands. *Diabet Care* 1995; 18: 1400–1401.
16. *Jaksch M., Hofmann S., Gerbitz K.D.* Glucagon receptor gene mutation in NIDDM. *Diabetologia* 1996; 39: 248.

Поступила 07.07.06

© Бабаджанова Г.Ю., 2006-10-05

[616.248-06:616.379-008.64]-092