

Полиморфизм гена *CYP7A1* и особенности дислипидемий у больных неалкогольной жировой болезнью печени в сочетании с гипотиреозом

Д.А. ЖАЛДАК, О.К. МЕЛЕХОВЕЦ, В.Ф. ОРЛОВСКИЙ

Сумской государственный университет МОН Украины, Сумы, Украина

Резюме

Цель исследования. Изучение связи полиморфных вариантов -204A > C (rs 3808607) гена *CYP7A1* с развитием дислипидемий у практически здоровых лиц, у больных с неалкогольной жировой болезнью печени (НАЖБП) и при сочетании НАЖБП с гипотиреозом.

Материалы и методы. Исследовали образцы ДНК и липидограммы 180 пациентов (1-я группа — 60 здоровых, 2-я группа — 60 больных с гипотиреозом и НАЖБП, 3-я группа — 60 больных с НАЖБП). Все пациенты прошли ультразвуковое исследование щитовидной железы, органов брюшной полости; рассчитан тест ФиброМакс.

Результаты. Во всех обследуемых группах чаще всего встречался гомозиготный генотип AA (86,6% случаев в 1-й группе, 80% случаев во 2-й группе и 83,3% случаев в 3-й группе). Развитие НАЖБП у носителей генотипа CC характеризуется наиболее выраженными изменениями липидного метаболизма (индекс атерогенности — ИА 7,32 в 3-й группе) по сравнению с генотипами AA (ИА 4,56 во 2-й группе и 1,73 в 1-й группе) и CC (ИА 6,43 во 2-й группе и 2,52 в 1-й группе) при состояниях функциональной недостаточности тиреоидных гормонов и относительной нормы.

Заключение. Проведенный анализ связи полиморфных вариантов rs 3808607 гена *CYP7A1* с нарушением липидного обмена в обследуемых группах показал, что достоверно более высокие уровни атерогенных фракций холестерина определялись при генотипе CC по сравнению с носителями генотипа AA и не зависели от наличия НАЖБП и гипотиреоза. Полученные данные позволяют рассматривать гомозиготный генотип AA как протекторный по отношению к дислипидемии вариант мутации rs 3808607 гена *CYP7A1*. Однако при состояниях функциональной недостаточности тиреоидных гормонов уровень триглицеридов достоверно выше при обоих генотипах, что свидетельствует о существенной роли гипотиреоза в развитии дислипидемий и НАЖБП.

Ключевые слова: дислипидемия, гипотиреоз, полиморфизм *CYP7A1*, неалкогольная жировая болезнь печени.

CYP7A1 gene polymorphism and the characteristics of dyslipidemias in patients with nonalcoholic fatty liver disease concurrent with hypothyroidism

D.A. ZHALDAK, O.K. MELEKHOVETS, V.F. ORLOVSKIY

Sumy State University, Ministry of Education and Science of Ukraine, Sumy, Ukraine

Aim. To investigate the association of the polymorphic variants -204A > C (rs 3808607) in the *CYP7A1* gene with the development of dyslipidemias in healthy individuals, in patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and in those with NAFLD concurrent with hypothyroidism.

Subjects and methods. DNA samples and lipidograms were examined in 180 patients, including 60 healthy individuals (Group 1), 60 patients with hypothyroidism concurrent with NAFLD (Group 2), and 60 patients with NAFLD (Group 3). All the patients underwent ultrasound examination of the thyroid gland and abdominal cavity organs; FibroMax scores were calculated.

Results. All the study groups most frequently showed a homozygous AA genotype (86.6% of cases in Group 1, 80% in Group 2, and 83.3% in Group 3). The development of NAFLD in CC genotype carriers is characterized by the most pronounced changes in lipid metabolism (atherogenic index (AI), 7.32 in Group 3) compared to the genotypes AA (AI, 4.56 in Group 2 and 1.73 in Group 1) and CC (AI, 6.43 in Group 2 and 2.52 in Group 1) in functional insufficiency of thyroid hormones and relative normal conditions.

Conclusion. The analysis of the relationship of polymorphic variants *CYP7A1* rs 3808607 to lipid metabolic disturbances in the study groups showed that the significantly higher levels of atherogenic cholesterol fractions were determined in the CC genotype compared to AA genotype carriers and they did not depend on the presence of NAFLD and hypothyroidism. The findings make it possible to consider the AA homozygous genotype of variant mutation *CYP7A1* rs 3808607 as protective against dyslipidemia. However, in functional insufficiency of thyroid hormones, the level of triglycerides is significantly higher in both genotypes, which suggests that hypothyroidism plays an essential role in the development of dyslipidemia and NAFLD.

Keywords: dyslipidemia, hypothyroidism, *CYP7A1* polymorphism, non-alcoholic fatty liver disease.

ДП — доверительный предел
ИА — индекс атерогенности
ЛПВП — липопротеины высокой плотности
ЛПНП — липопротеины низкой плотности
ПЦР — полимеразная цепная реакция

ТГ — триглицериды
ХС — холестерин (холестерол)
ЩЖ — щитовидная железа
CYP7A1 — холестерол-7 α -гидроксилаза

Сведения об авторах:

Мелеховец Оксана Константиновна — доцент кафедры социальной и семейной медицины

Орловский Виктор Феликсович — проф., зав. каф. социальной и семейной медицины

Контактная информация:

Жалдак Дарья Александровна — аспирант 3-го года обучения каф. социальной и семейной медицины; e-mail: dashalukyanenko@gmail.com

Коррекция нарушений липидного обмена является приоритетным направлением в клинической практике врачей любой специальности. С одной стороны, это связано с широким распространением дислипидемий, а с другой — с увеличением метаболически обусловленных заболеваний и их фатальных осложнений [1]. Дислипидемии — это нарушение функции и/или состава липидов и липопротеинов крови, что может быть следствием многочисленных причин и способно самостоятельно или во взаимодействии с другими факторами риска обуславливать манифестацию атеросклеротического процесса [2]. В первую очередь необходимо учитывать повышение уровня общего холестерина (ХС), ХС липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) и триглицеридов (ТГ). Дислипидемии могут быть следствием генетических нарушений (первичные) и/или сопутствующих заболеваний (вторичные) [2, 3].

Гипотиреоз — одна из наиболее распространенных форм тиреоидной дисфункции [4]. Это клинический синдром, который обусловлен стойким дефицитом тиреоидных гормонов в организме вследствие различных причинных факторов, проявляется нарушением обмена веществ, вызывая изменения всех органов и систем организма [5, 6]. Снижение тиреоидной функции при гипотиреозе, как правило, сопровождается нарушением липидного обмена — повышением уровня общего ХС, ХС липопротеинов очень низкой плотности, ХС ЛПНП, снижением уровня ХС липопротеинов высокой плотности (ЛПВП), главным образом ЛПВП-2, а также повышением концентрации апо-β/апо-α₁ ТГ [7]. Одну из ключевых позиций в метаболизме стероидов занимает фермент суперсемейства цитохромов P450 — холестерин-7α-гидроксилаза (*CYP7A1*). Фермент *CYP7A1*, являясь оксидоредуктазой, служит лимитирующим фактором в превращении холестерина (ХС) в 7α-гидроксихолестерол, тем самым либо увеличивая синтез ХС, либо уменьшая его за счет активации синтеза желчных кислот. При повышенном уровне ХС *CYP7A1* активирует ядерный рецептор LXR (liver X-receptor), что приводит к усилению продукции желчных кислот и уменьшению синтеза ХС гепатоцитами. Ядерные рецепторы тиреоидных гормонов LXR и TR совместно контролируют метаболизм ХС в печени путем взаимодействия сигнальных путей с вовлечением транскрипционного фактора ChREBP (carbohydrate-response element-binding protein) [8]. Полиморфизм -204A>C (rs 3808607) в промоторной зоне гена *CYP7A1* влияет на активность *CYP7A1* [9], что может приводить к нарушению метаболизма ХС и желчных кислот и проявляется гиперхолестеринемией и триглицеридемией в условиях сниженной функции щитовидной железы (ЩЖ) [10].

Цель исследования — изучить связь полиморфных вариантов -204A > C (rs 3808607) гена *CYP7A1* с развитием дислипидемий у практически здоровых лиц, у больных НАЖБП и при сочетании НАЖБП с гипотиреозом.

Материалы и методы

В исследование включили 180 пациентов, которых распределили на группы: 1-я (контрольная) — 60 практически здоровых человек без заболеваний ЩЖ и печени, но имеющих отклонения от нормы в показателях липидограммы; 2-я — 60 пациентов с впервые выявленным гипотиреозом (уровень тиреотропного гормона — ТТГ ≥10

мМЕ/мл) и с НАЖБП; 3-я — 60 пациентов с НАЖБП, которую диагностировали согласно «Рекомендациям по диагностике и лечению неалкогольной жировой болезни печени» (М., 2012) [11]. Группы сопоставимы по возрасту (средний возраст в 1-й группе 50,4 года со стандартным отклонением 8,5 года, во 2-й группе — 49,4 года со стандартным отклонением 9 лет, в 3-й группе — 50,2 года со стандартным отклонением 9 лет) и полу (в 1-й группе женщин 52%, во 2-й группе 52% и в 3-й группе 55%).

Всем больным ферментативным методом определяли в сыворотке крови уровни общего ХС, ТГ, ЛПНП, ЛПВП. Индекс атерогенности (ИА) рассчитывали по формуле: $IA = (\text{общий ХС} - \text{ЛПВП})/\text{ЛПВП}$. Обязательным было проведение ультразвукового исследования ЩЖ и органов брюшной полости с определением степени стеатоза печени: I степень — ткань печени диффузно уплотнена, сосудистый рисунок обеднен, размеры правой доли печени 15–17 см; II степень — ткань печени диффузно уплотнена, сосудистый рисунок обеднен, размеры правой доли печени 17–19 см, появление эффекта дорсального затухания эхо-сигнала; III степень — ткань печени диффузно уплотнена, размеры правой доли печени больше 19 см, полный эффект дорсального затухания эхо-сигнала, при котором нижний край печени практически не визуализируется, выраженное обеднение сосудистого рисунка (печень как «сквозь молоко»). Для косвенной оценки степени выраженности морфологических изменений в печени проводили тест ФиброМакс, который рассчитывали с помощью апробированной в многоцентровых исследованиях запатентованной формулы с учетом коэффициента регрессии [12, 13]: $f = 4,467 \cdot \log[\alpha_2\text{-мак-роглобулин (в г/л)}] - 1,357 \cdot \log[\text{гаптоглобин (в г/л)}] + 1,017 \cdot \log[\gamma\text{-глутамилтранспептидаза (ед/л)}] + 0,0281 \cdot [\text{возраст (годы)}] + 1,737 \cdot \log[\text{билирубин (ммоль/л)}] - 1,184 \cdot [\text{аполипопротеин А1 (вг/л)}] + 0,301 \cdot \text{пол (ж=0, м=1)} - 5,540$ с использованием программного обеспечения (Materialise Ukraine).

Тотальную ДНК выделяли из образцов крови по методике Chelex (Grimberg и соавт., 1989). Центрифугировали кровь на протяжении 2 мин в мини-центрифуге Bio-SanMicroSpin12 (Латвия) при 14 500 об/мин. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в 200 мкл микропробирках в аплификаторе iCycler («BioRad», США). Для изучения полиморфизма rs 3808607 гена *CYP7A1* использовали праймеры 5'-AATGTTTTTCCCAGTTCTCTTTTC-3' (прямой) и 5'-AATAGCCATTTGTTTCATTCTATTAG-3' (обратный), описанные ранее [14]. Затем проводили рестрикцию продуктов ПЦР-амплификации размером 393 п.н., образованных при использовании пары праймеров с помощью рестриктазы Eco31I (BsaI), («Thermo Fisher Scientific», США) с учетом условий производителя. Распределение продуктов рестрикции ампликлонов, которые генерировались в ПЦР, проводили методом электрофореза в 3% агарозном геле в TBE-буфере (0,089 М трис-НСl рН 8,0; 0,089 М борная кислота; 0,002 Мпа₃EDTA) при постоянном напряжении электрического поля 2,5 Вт/см и комнатной температуре на протяжении 2–3 ч в аппарате для горизонтального гелеэлектрофореза («Peqlab Biotechnologie GmbH», Германия). Агарозный гель красили в TBE-буфере с 5 мкг/мл бромистого этидиума на протяжении 15 мин. После рестрикции получали 2 фрагмента размерами 93 и 300 п.н. для аллеля А и 3 фрагмента размерами 39, 93 и 261 п.н. для аллеля С соответственно.

Результаты анализа связи полиморфных вариантов rs 38088607 гена *CYP7A1* с показателями липидного обмена у обследуемых групп

Группа	Гено-тип	Размер выборки	Общий ХС, ммоль/л		ТГ, ммоль/л		ЛПНП, ммоль/л		ЛПВП, ммоль/л		ИА	
			СР	ДП	СР	ДП	СР	ДП	СР	ДП	СР	ДП
1-я	АА	52	4,177	±0,088	0,955	±0,059	3,172	±0,146	1,553	±0,041	1,738	±0,119
	СС	8	4,960	±0,225	1,359	±0,152	3,700	±0,371	1,403	±0,104	2,525	±0,302
<i>p</i>			0,000000020415		0,000006428616		0,010273228863		0,009326370228		0,000009565628	
2-я	АА	48	6,016	±0,119	2,170	±0,201	4,586	±0,111	1,089	±0,034	4,566	±0,335
	СС	12	6,657	±0,238	4,395	±0,401	3,925	±0,223	0,939	±0,068	6,439	±0,671
<i>p</i>			0,000010868926		0,0000001900611		0,0000001732463		0,000218524650		0,000005607731	
3-я	АА	50	6,184	±0,0076	1,437	±0,040	5,034	±0,069	1,018	±0,025	5,114	±0,220
	СС	10	6,711	±0,169	3,431	±0,089	4,883	±0,155	0,814	±0,057	7,3244	±0,493
<i>p</i>			0,000000437474		0,000000000000		0,081025320389		0,000000014627		0,000000000029	

Примечание. *p* — для различий между показателями при генотипах АА и СС.

Статистическую обработку полученных данных проводили с применением программного обеспечения Statistica 10. Использовали методику однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с определением среднего значения каждой выборки и доверительного предела (ДП) при коэффициенте надежности 95%, а также уровней статистической достоверности (*p*).

Клинико-лабораторные и инструментальные исследования проводили на базе поликлинического отделения Сумской городской клинической больницы №1 (Сумы, Украина), генетически-молекулярное исследование — в лаборатории ООО «Эласко-Ариика» (Одесса, Украина).

Результаты

Во всех обследуемых группах наиболее часто встречался гомозиготный генотип АА (86,6% в 1-й группе, 80% во 2-й группе и 83,3% в 3-й группе), в меньшем процентном соотношении выявлен гомозиготный генотип СС (13,4, 20 и 16,7 соответственно), тогда как гетерозиготный генотип АС не выявлен ни у одного пациента.

В 1-й (контрольной) группе при генотипе АА все показатели липидограммы находились в пределах нормы, тогда как при генотипе СС показатели липидограммы — в пределах нормы, но статистически достоверно ($p < 0,001$) выше по сравнению с уровнем общего ХС, ЛПНП и уровнем ТГ у пациентов с генотипом АА ($p < 0,01$); уровень ЛПВП достоверно меньше, чем при генотипе АА ($p < 0,001$).

Носители гомозиготного генотипа АА 2-й группы имели повышенный уровень общего ХС и ЛПНП, ТГ и сниженный уровень ЛПВП, тогда как у пациентов 3-й группы при таком же генотипе наблюдался достоверно более высокий уровень общего ХС и ЛПНП ($p < 0,001$), при этом уровни ТГ и ЛПВП находились в пределах нормы и достоверно не отличались от таковых во 2-й группе.

Носители гомозиготного генотипа СС 2-й группы имели повышенный уровень общего ХС, ТГ и сниженный уровень ЛПВП, тогда как уровень ЛПНП находился в пределах нормы. У пациентов 3-й группы при таком же генотипе наблюдался достоверно более высокий уровень общего ХС, ТГ и ЛПНП ($p < 0,001$), а уровень ЛПВП был значительно снижен ($p < 0,05$) (см. таблицу).

Обсуждение

Несмотря на интенсивные исследования полиморфизма одиночных нуклеотидов гена *CYP7A1* и их ассоциации с различными формами нарушений метаболизма ХС, в литературе еще не накоплено достаточного количества информации о характере распределения генотипов и соответственно степени их прогностического риска в различных этнических группах [9, 10, 14]. В отличие от данных, полученных Quang Sai и соавт. [8], свидетельствующих о преобладающем гетерозиготном варианте АС гена *CYP7A1* в азиатской популяции, нами установлено, что в обследуемых группах превалировал гомозиготный вариант АА, который встречался более чем в 80% случаев.

Анализ связи полиморфных вариантов rs 38088607 гена *CYP7A1* с нарушением липидного обмена в обследуемых группах показал, что достоверно более высокие уровни атерогенных фракций ХС выявлены при генотипе СС по сравнению с носителями генотипа АА и не зависели от наличия НАЖБП и гипотиреоза. При этом в контрольной группе носительство генотипа СС обуславливало верхнеграницные уровни общего ХС, ЛПНП и ТГ и предельно низкие уровни ЛПВП со статистически значимым различием между генотипами.

При сравнении атерогенных фракций липидограммы у пациентов 2-й группы с гипотиреозом и НАЖБП и 3-й группы с НАЖБП в каждом из генотипов выявлено достоверно более выраженное повышение уровня общего ХС и ТГ, при этом уровень ЛПНП находился в пределах нормы с достоверно более высокими значениями при генотипе АА по сравнению с генотипом СС в каждой из групп. Уровень ЛПВП был значительно снижен при генотипе СС в обеих группах по сравнению с генотипом АА без достоверных межгрупповых различий ($p > 0,05$).

Таким образом, развитие НАЖБП у носителей генотипа СС характеризуется наиболее выраженными изменениями липидного метаболизма (ИА 7,32 в 3-й группе) по сравнению с генотипами АА (ИА 4,56 во 2-й группе и 1,73 в 1-й группе) и СС (ИА 6,43 во 2-й группе и 2,52 в 1-й группе), что позволяет расценивать гомозиготный генотип АА как протекторный вариант мутации rs 38088607 гена *CYP7A1*. Тем не менее при функциональной недоста-

точности тиреоидных гормонов уровень ТГ даже при благополучном генотипе остается достоверно выше, чем при соответствующем варианте у пациентов 3-й группы с наличием только НАЖБП. Это свидетельствует о существенной роли гипотиреоза в развитии дислипидемии и

НАЖБП и необходимости проведения заместительной гормональной терапии для эффективной коррекции липидного дисбаланса при гипотиреозе и НАЖБП.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Петухов В.А. Липидный дистресс — синдром: диагностика и методы лечения. М: ВЕДИ; 2003:88. [Petukhov VA. *Lipidnyj distress-sindrom: diagnostika i metody lechenija*. M: VEDI; 2003:88. (In Russ.)].
2. *Руководство по кардиологии*. Под ред. Коваленко В.Н. Киев: МОРИОН; 2008:184-221. [Rukovodstvo po kardiologii. Pod. Red. Kovalenko V.N. Kiev: MORION; 2008:184-221. (In Russ.)].
3. *Поликлиническая терапия*. Под ред. Галкина В.А. Издательство Медицина; 2000:51-58. [Poliklinicheskaja terapija. Pod. Red. GalkinVA. Izdatel'stvo Medicina; 2000:51-58. (In Russ.)].
4. Кравчун Н.А., Чернявская И.В. Гипотиреоз: эпидемиология, диагностика, опыт лечения. *Проблемы эндокринной патологии*. 2011;3:27-34. [Kravchun NA, Chernjavskaja IV. Hypothyroidism: epidemiology, diagnosis, treatment experience. *Problemy endokrinnoj patologii*. 2011;3:27-34. (In Russ.)].
5. Подзолков А.В., Фадеев В.В. Высоко- и низконормальный уровень ТТГ: клиническая картина, психоэмоциональная сфера и качество жизни пациентов с гипотиреозом. *Клиническая и экспериментальная тиреодология*. 2010;6(4):58-68. [Podzolkov AV, Fadeyev VV. The TSH dynamics in upper- and low-normal range in patients with primary hypothyroidism: clinical presentation, well-being and quality of life. *Klinicheskaja i eksperimental'naja tireoidologija*. 2010;6(4):58-68. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.14341/ket20106458-68>
6. Фадеев В.В. Современные принципы диагностики и лечения гипотиреоза. *Земский врач*. 2010;2:20-26. [Fadeev VV. Current approach to diagnosis and treatment of hypothyroidism. *Zemskij vrach*. 2010;2:20-26. (In Russ.)].
7. Muls E., Kolanowski J. Et al. The effects of orlistat on weight and serum lipids in obese patients with hypercholesterolemia: A randomized, double-blind, placebo controlled multicentre study. *International Journal of Obesity*. 2001;25(11):1713-1721. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0801814>
8. Qiang Cai et. al. Relationship between CYP7A1 -204A>C polymorphism with gallbladder stone disease and serum lipid levels: a meta-analysis. *Lipid in Health and Disease*. 2014;13:126. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-13-126>
9. De Castro-Oros I., Pampin S., Cofan M. Et. Al. Promoter variant -204A > C of the cholesterol 7alpha-hydroxylase gene: association with response to plant sterols in humans and increased transcriptional activity intranected HepG2 cells. *Clinical Nutrition*. 2011;30(2):239-246. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2010.07.020>
10. Couture P, Otvos JD, Cupples LA et al. Association of the A-204C polymorphism in the cholesterol 7 α -hydroxylase gene with variations in plasma low density lipoprotein cholesterol levels in the Framingham Offspring Study. *Journal of lipid research*. 1999;40:1883-1889.
11. Ивашкин В.Т., Драпкина О.М. *Диагностика и лечение неалкогольной жировой болезни печени (методические рекомендации)*. М.: ООО «Издательский дом «М-Вести». 2012:20. [Ivashkin VT, Drapkina OM. *Diagnostika i lechenie nealkogol'noj zhirovoy bolezni pecheni (metodicheskie rekomendacii)*. M.: ООО «Izdatel'skij dom «M-Vesti». 2012:20. (In Russ.)].
12. Ratziu V, Massard J, Charlotte F et al. Diagnostic value of biochemical markers (FibroTest-FibroSURE) for the prediction of liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Gastroenterol*. 2006;6:6. <https://doi.org/10.1186/1471-230X-6-6>
13. Sanal MG. Biomarkers in nonalcoholic fatty liver disease—the emperor has no clothes? *World J. Gastroenterol*. 2015;21(11):3223-3231. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i11.3223>
14. Mounia Qrafi, Youssef Amar, Jamaledine Bourkadi et al. The CYP7A1 gene rs 3808607 variant is associated with susceptibility of tuberculosis in Moroccan population. *The Pan African Medical Journal*. 2014;18:1. <https://doi.org/10.11604/pamj.2014.18.1.3397>

Поступила 16.01.17