

# Полиморфные варианты гена глутатионредуктазы – новые генетические маркеры предрасположенности к сахарному диабету 2-го типа

Ю.Э. Азарова<sup>✉</sup>, Е.Ю. Клесова, А.В. Полоников

ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России, Курск, Россия

## Аннотация

**Цель.** Анализ ассоциаций полиморфных вариантов гена фермента антиоксидантной системы глутатионредуктазы *GSR* с предрасположенностью к сахарному диабету 2-го типа (СД 2).

**Материалы и методы.** В наблюдательном моноцентровом поперечном контролируемом исследовании приняли участие 1032 больных СД 2 (640 женщин, 392 мужчины; средний возраст – 61,1±4,8 года) и 1056 практически здоровых добровольцев (676 женщин, 380 мужчин; средний возраст – 60,9±6,2 года). Пищевые привычки оценивались ретроспективно по данным анкетирования. У всех участников исследования забирали 10 мл крови для генетических и биохимических исследований. Генотипирование полиморфизмов гена *GSR* проводили с использованием технологии iPLEX на геномном времяпролетном масс-спектрометре MassArray Analyzer 4 (Agena Bioscience).

**Результаты.** Нами впервые выявлена взаимосвязь полиморфизмов rs2551715, rs2911678, rs3757918 гена *GSR* и пониженного риска развития СД 2 в русской популяции. При этом протективные эффекты вариантов гена глутатионредуктазы проявлялись только у лиц с нормальной массой тела при условии употребления ими свежих овощей и фруктов, тогда как у лиц, потребляющих недостаточно растительной пищи, а также у всех больных с избыточной массой тела и ожирением защитный эффект *GSR* не наблюдался. У больных СД 2 содержание перекиси водорода и димера глутатиона было резко повышено по сравнению с контролем. Мы также установили, что полиморфизм rs2551715 ассоциирован с пониженным содержанием перекиси водорода в плазме крови больных СД 2, тогда как SNP rs2911678 ассоциирован со снижением концентрации окисленной формы глутатиона. Биоинформатический анализ подтвердил положительный эффект альтернативных аллелей на экспрессию *GSR*, выявил ближайших белковых партнеров фермента и их совместное участие в метаболизме ацетил-коэнзима А, катаболизме перекиси водорода и контроле клеточного редокс-гомеостаза.

**Заключение.** Впервые установлено, что полиморфные варианты гена *GSR* rs2551715, rs2911678, rs3757918 ассоциированы с предрасположенностью к СД 2, но их связь с заболеванием модулируется употреблением свежих овощей и фруктов и зависит от индекса массы тела.

**Ключевые слова:** сахарный диабет 2-го типа, глутатионредуктаза, однонуклеотидный полиморфизм, индекс массы тела

**Для цитирования:** Азарова Ю.Э., Клесова Е.Ю., Полоников А.В. Полиморфные варианты гена глутатионредуктазы – новые генетические маркеры предрасположенности к сахарному диабету 2-го типа. Терапевтический архив. 2021; 93 (10): 1164–1170. DOI: 10.26442/00403660.2021.10.201101

ORIGINAL ARTICLE

## Polymorphic variants of glutathione reductase – new genetic markers of predisposition to type 2 diabetes mellitus

Iuliia E. Azarova<sup>✉</sup>, Elena Yu. Klyosova, Alexey V. Polonikov

Kursk State Medical University, Kursk, Russia

## Abstract

**Aim.** To study the associations of three common single nucleotide variants of the gene encoding antioxidant system enzyme, glutathione reductase *GSR* with a predisposition to type 2 diabetes (T2D).

**Materials and methods.** The observational mono-center transverse controlled study involved 1032 type 2 diabetics (640 women, 392 men; mean age 61.1±4.8 years) and 1056 healthy volunteers (676 women, 380 men; mean age 60.9±6.2 years). Eating habits were evaluated retrospectively according to questionnaire data. A 10 ml blood sample was drawn from all participants in the study for genetic and biochemical tests. Genotyping was done with the use of the iPLEX technology on MassArray System.

**Results.** We first identified the relationship of the polymorphisms rs2551715, rs2911678, rs3757918 of the *GSR* gene with a reduced risk of developing T2D in the Russian population. At the same time, the protective effects of the variants of the glutathione reductase gene manifested only in individuals with normal body weight provided they consumed fresh vegetables and fruits, whereas in those with insufficient consumption of plant foods, as well as in all overweight and obese patients, the protective effect of *GSR* was not observed. In patients with T2D, the plasma levels of hydrogen peroxide and the glutathione dimer were sharply increased compared with the controls. We also found that the rs2551715 polymorphism was associated with a lower concentration of hydrogen peroxide in the blood plasma of patients with T2D, while SNP rs2911678 was associated with a decrease in the concentration of the oxidized form of glutathione. Bioinformatical analysis confirmed the positive effect

## Информация об авторах / Information about the authors

✉ **Азарова Юлия Эдуардовна** – канд. мед. наук, доц. каф. биологической химии, зав. лаб. биохимической генетики и метаболизма НИИ генетической и молекулярной эпидемиологии. Тел.: +7(960)696-55-00; e-mail: azzzzar@yandex.ru;

ORCID: 0000-0001-8098-8052

**Клесова Елена Юрьевна** – мл. науч. сотр. лаб. биохимической генетики и метаболизма НИИ генетической и молекулярной эпидемиологии. ORCID: 0000-0002-1543-9230

**Полоников Алексей Валерьевич** – д-р мед. наук, проф. каф. биологии, медицинской генетики и экологии, дир. НИИ генетической и молекулярной эпидемиологии. ORCID: 0000-0001-6280-247X

✉ **Iuliia E. Azarova.** E-mail: azzzzar@yandex.ru; ORCID: 0000-0001-8098-8052

**Elena Yu. Klyosova.** ORCID: 0000-0002-1543-9230

**Alexey V. Polonikov.** ORCID: 0000-0001-6280-247X

of alternative alleles on *GSR* expression and revealed the closest protein partners of the enzyme and their joint participation in the metabolism of acetyl-CoA, the catabolism of hydrogen peroxide and the control of cellular redox homeostasis.

**Conclusion.** Polymorphic variants of the *GSR* gene rs2551715, rs2911678, rs3757918 are associated with a predisposition to T2D, but their relationship with the disease is modulated by the consumption of fresh vegetables and fruits and depends on body mass index.

**Keywords:** type 2 diabetes mellitus, glutathione reductase, single nucleotide polymorphism, body mass index

**For citation:** Azarova IuE, Klyosova EYu, Polonikov AV. Polymorphic variants of glutathione reductase – new genetic markers of predisposition to type 2 diabetes mellitus. *Terapevticheskii Arkhiv (Ter. Arkh.)*. 2021; 93 (10): 1164–1170. DOI: 10.26442/00403660.2021.10.201101

## Введение

Генетические основы сахарного диабета 2-го типа (СД 2) интенсивно изучаются во всем мире: в период с 2007 г. по настоящий момент проведено более 140 полногеномных ассоциативных исследований, включавших почти 4 млн больных и суммарно установивших 3795 ассоциаций однонуклеотидных вариантов ДНК (SNPs) с различными фенотипами СД 2 [1]. Несмотря на то, что биологическая интерпретация полученных данных представляет собой трудную задачу (абсолютное большинство обнаруженных локусов находится в межгенных спейсерах, некодирующих последовательностях генома и не имеют прямого отношения к патогенезу заболевания), были идентифицированы гены, ассоциированные с инсулинорезистентностью, ожирением, дисфункцией  $\beta$ -клеток и снижением инкретинового ответа [2].

Важным звеном в цепи событий, приводящих к развитию СД 2, является нарушение редокс-гомеостаза, которое характеризуется избыточной продукцией свободнорадикальных соединений, дефицитом антиоксидантной защиты и рассматривается в качестве главного механизма повреждения внутриклеточных сигнальных молекул, результатом чего являются дисфункция островкового аппарата поджелудочной железы и прогрессирующая инсулинорезистентность [3]. В исследованиях последних лет убедительно показано, что неправильное питание, в первую очередь недостаток свежих овощей и фруктов, избыточная масса тела (МТ) и ожирение снижают чувствительность клеток к инсулину и провоцируют манифестацию СД 2 [4, 5]. Баланс в про- и антиоксидантной системе в значительной степени детерминирован способностью клеток поддерживать пул универсального антиоксиданта, глутатиона, в восстановленном состоянии. Ключевым ферментом регенерации функционально активного мономера глутатиона GSH из его димера GSSG является глутатионредуктаза *GSR*. Катализ протекает в присутствии биохимического восстановителя НАДФН·Н<sup>+</sup> (восстановленного никотинамидадениндинуклеатидфосфата) согласно уравнению:  $GSSG + \text{НАДФН} \cdot \text{Н}^+ \rightarrow 2\text{GSH} + \text{НАДФ}^+$ . Скорость реакции зависит от активности белковой части фермента (генетически детерминированной) и, кроме того, определяется обеспеченностью клеток необходимыми кофакторами, в частности НАДФН·Н<sup>+</sup>. Вопросы взаимосвязи между потреблением овощей и фруктов, МТ и полиморфными вариантами генов антиоксидантной системы, таких как ген глутатионредуктазы, на сегодняшний день остаются открытыми и требуют изучения для расшифровки фундаментальных основ заболевания.

**Цель исследования** – изучить ассоциации однонуклеотидных вариантов гена *GSR* rs2551715, rs2911678, rs3757918 с риском СД 2 у больных и здоровых лиц, а также оценить триггерную роль свежих овощей и фруктов в реализации наследственной предрасположенности к СД 2 у носителей различных генотипов *GSR*.

## Материалы и методы

Протокол исследования одобрен Региональным этическим комитетом при Курском государственном меди-

цинском университете (выписка из протокола №10 от 12.12.2016). На основе письменного информированного согласия в исследование были включены больные СД 2, получавшие стационарное лечение на базе эндокринологического отделения Курской городской клинической больницы скорой медицинской помощи с декабря 2016 по октябрь 2019 г. Группу здоровых индивидов составили доноры областной станции переливания крови, а также материал наших предыдущих исследований, депонированный в биобанке НИИ генетической и молекулярной эпидемиологии ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» [6]. Критерии включения в группы больных и здоровых были подробно описаны нами ранее [7].

Участники исследования были распределены по 2 основным группам: группа больных СД 2 и группа здоровых (контроль). Пациенты с СД 2 и контроль были стратифицированы по потреблению свежих овощей и фруктов и индексу МТ (ИМТ) на 4 подгруппы: в 1-ю вошли больные СД 2 и здоровые лица, ежедневно потребляющие свежие овощи и фрукты и имеющие нормальную МТ (ИМТ < 25); во 2-ю – больные СД 2 и здоровые лица, ежедневно потребляющие растительную пищу и имеющие избыточную МТ или ожирение (ИМТ > 25); в 3-ю – больные СД 2 и здоровые лица, не потребляющие свежие овощи и фрукты каждый день и имеющие нормальную МТ (ИМТ < 25); в 4-ю – больные СД 2 и здоровые лица, не потребляющие овощи и фрукты каждый день и имеющие избыточную МТ или ожирение (ИМТ > 25). ИМТ, статус курения, наследственной отягощенности по СД 2, потребление свежих овощей и фруктов оценивали путем анкетирования. В отношении последнего параметра участникам предлагалось указать, как часто они употребляют в пищу свежие овощи и фрукты и в каких количествах. Ежедневное потребление не менее 6 порций овощей и фруктов (400 г) было классифицировано как достаточное, более редкое или меньшее потребление растительной пищи – как недостаточное в соответствии с критериями Всемирной организации здравоохранения [8].

Концентрации перекиси водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) и GSSG определяли с помощью наборов OxiSelect ROS/RNS Assay kit, GSH/GSSG Assay kit (Cell Biolabs, США) флуориметрическим и колориметрическим методом соответственно на микропланшетном ридере Varioscan Flash (Thermo Fisher Scientific, США). Для проведения генетических исследований геномную ДНК выделяли из 5 мл венозной крови стандартным методом фенольно-хлороформной экстракции. Генотипирование полиморфизмов гена *GSR* проводили с использованием технологии iPLEX на геномном времяпролетном масс-спектрометре MassArray Analyzer 4 (Agena Bioscience).

Ассоциации генотипов с риском СД 2 изучали методом логистической регрессии с поправкой на пол, возраст и ИМТ с помощью программы SNPStats [9]. Для функционального аннотирования вариантов ДНК использовали онлайн-ресурсы GTEch Portal [10], STRING [11] и GENE Ontology [12]. Количественные биохимические показатели проверяли на нормальность распределения по критерию Колмогорова–Смирнова. Показатели с нормальным распределением были описаны в формате «среднее значение ±

**Таблица 1. Демографические и клинические характеристики участников исследования****Table 1. Demographic and clinical characteristics of study subjects**

Параметры сравнения	Контроль (n=1064)	Больные СД 2 (n=1032)	p
Возраст, лет (ср. ± ст. от.)	61,00±7,82	61,42±10,58	0,308
Мужчины, абс. (%)	392 (36,8)	363 (35,2)	0,453
Женщины, абс. (%)	672 (63,2)	669 (64,8)	
ИМТ, кг/м <sup>2</sup> (ср. ± ст. от.)	27,04±3,55	32,08±6,71	<0,0001
Ежедневно потребляющие овощи и фрукты, абс. (%)	886 (83,3)	504 (48,8)	<0,0001
Курящие, абс. (%)	308 (28,9)	232 (22,5)	0,0009
Стаж диабета, Ме [Q1; Q3]	–	10,03 [4; 14]	–
Наследственная отягощенность, абс. (%)	–	400 (38,8)	–
HbA <sub>1c</sub> , %, Ме [Q1; Q3]	4,58 [4,11; 4,87]	9,10 [7,90; 11,00]	<0,0001
Глюкоза крови натощак, Ме [Q1; Q3]	4,71 [4,39; 4,84]	12,00 [9,49; 14,90]	<0,0001
Общий холестерин, ммоль/л, Ме [Q1; Q3]	3,06 [2,86; 3,12]	4,93 [4,14; 5,90]	<0,0001
ЛПНП, ммоль/л, Ме [Q1; Q3]	1,74 [1,60; 1,79]	3,10 [2,50; 4,05]	<0,0001
ЛПВП, ммоль/л, Ме [Q1; Q3]	1,47 [1,36; 1,62]	0,84 [0,73; 1,00]	<0,0001
ТАГ, ммоль/л, Ме [Q1; Q3]	1,15 [0,98; 1,23]	2,17 [1,55; 2,93]	<0,0001

Примечание. HbA<sub>1c</sub> – гликированный гемоглобин, ЛПНП – липопротеины низкой плотности, ЛПВП – липопротеины высокой плотности, ТАГ – триацилглицеролы, ст. от. – стандартное отклонение.

**Таблица 2. Частоты аллелей и генотипов изучаемых полиморфизмов GSR у больных СД 2 и здоровых лиц****Table 2. Frequencies of alleles and genotypes of GSR polymorphisms in patients with type 2 diabetes mellitus (T2D) and healthy individuals**

SNP гена GSR	Генотип/аллель	Контроль (n=1064)	Больные СД 2 (n=1032)	ОШ* (95% ДИ)*	p*
rs2551715 (C>T)	C/C	317 (30,6)	356 (34,8)	1,00	
	C/T	526 (50,7)	490 (47,9)	0,79 (0,65–0,97) <sup>D</sup>	0,028 <sup>D</sup>
	T/T	194 (18,7)	177 (17,3)	0,89 (0,79–1,01)	0,067
	T	0,441	0,413		
rs2911678 (T>A)	T/T	535 (51,2)	540 (52,8)	1,00	
	T/A	425 (40,7)	418 (40,9)	0,73 (0,50–1,07) <sup>R</sup>	0,110 <sup>R</sup>
	A/A	85 (8,1)	64 (6,3)	0,92 (0,80–1,05)	0,207
	A	0,285	0,267		
rs3757918 (T>C)	T/T	309 (29,6)	310 (30,1)	1,00	
	T/C	506 (48,5)	512 (49,7)	0,86 (0,68–1,09) <sup>R</sup>	0,210 <sup>R</sup>
	C/C	229 (21,9)	208 (20,2)	0,96 (0,85–1,08)	0,469
	C	0,462	0,45		

Примечание. D – доминантная модель, R – рецессивная модель; \*расчет выполнен с поправкой на пол, возраст и ИМТ.

стандартное отклонение», в качестве теста для оценки статистической значимости различий между группами использовали тест Стьюдента. Показатели с ненормальным распределением описывали с использованием медианы, 1 и 3-го квартиля в формате медианы – Ме [Q1; Q3], критерий Манна–Уитни применяли для тестирования статистической значимости результатов расчетов. Выявленные межгрупповые отличия считались значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты

В исследовании приняли участие 2096 жителей Центральной России, преимущественно Курской области, из которых 1032 человека составили группу больных СД 2 и 1064 здоровых индивида вошли в группу контроля (табл. 1). Пациенты с СД 2 и здоровые отличались по своему отношению к растительной пище: только 48,8% боль-

ных ежедневно потребляли достаточно свежих овощей и фруктов (в среднем 6 порций массой около 400 г согласно критериям Всемирной организации здравоохранения, тогда как значение этого показателя в группе контроля составило 83,3%. У больных СД 2 также выявлены классические нарушения углеводного и липидного обмена.

Частоты аллелей и генотипов изучаемых полиморфизмов гена GSR представлены в табл. 2. Все исследованные SNPs находились в соответствии с равновесием Харди–Вайнберга. Статистически значимых различий в частотах аллелей не наблюдалось ( $p > 0,05$ ). Генотипы C/T-T/T варианта rs2551715 были значимо ассоциированы с пониженным риском развития СД 2 (отношение шансов – ОШ 0,82, 95% доверительный интервал – ДИ 0,69–0,99;  $p = 0,041$ ). Ассоциация оставалась значимой и после введения поправки на пол, возраст и ИМТ (ОШ 0,79, 95% ДИ 0,65–0,97;

**Таблица 3. Частоты аллелей и генотипов изучаемых полиморфизмов GSR у больных СД 2 и здоровых лиц, стратифицированных по потреблению овощей и фруктов и ИМТ****Table 3. Frequencies of alleles and genotypes of GSR polymorphisms in patients with T2D and healthy individuals, stratified by fruit and vegetable consumption and BMI**

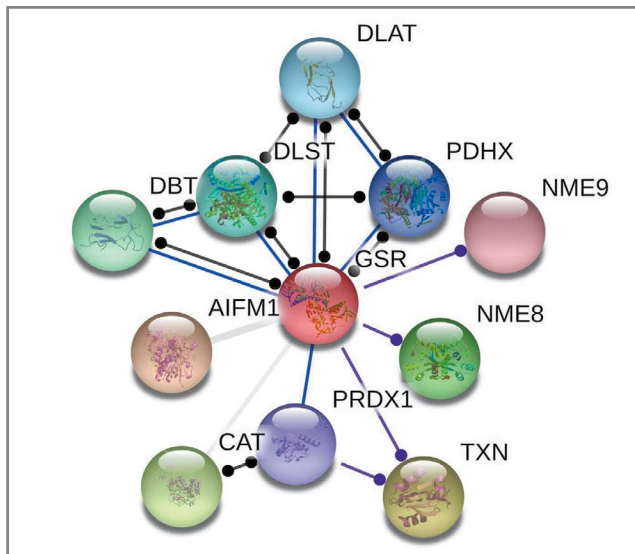
Потребляющие достаточно овощей и фруктов									
SNP гена GSR	Генотип/ аллель	ИМТ<25				ИМТ>25			
		Контроль (n=174)	Больные СД 2 (n=64)	ОШ <sup>R</sup> (95% ДИ) <sup>R</sup>	P <sup>R</sup>	Контроль (n=712)	Больные СД 2 (n=440)	ОШ <sup>R</sup> (95% ДИ) <sup>R</sup>	P <sup>R</sup>
rs2551715 (C>T)	C/C	54 (31,8)	25 (40,3)	1,00		211 (30,6)	151 (34,6)	1,00	
	C/T	74 (43,5%)	31 (50,0)		0,008	358 (52,0)	210 (48,2)		0,890
	T/T	42 (24,7)	6 (9,7)	0,33 (0,13–0,82)		120 (17,4)	75 (17,2)	0,98 (0,71–1,34)	
rs2911678 (T>A)	T/T	81 (49,7)	35 (57,4)	1,00		361 (51,1)	238 (54,5)	1,00	
	T/A	66 (40,5)	25 (41)		0,023	293 (41,5)	173 (39,6)		0,320
	A/A	16 (9,8)	1 (1,6)	0,16 (0,02–0,98)		52 (7,4)	26 (6,0)	0,78 (0,48–1,28)	
rs3757918 (T>C)	T/T	47 (28,1)	17 (27,0)	1,00		203 (29,0)	142 (32,3)	1,00	
	T/C	84 (50,3)	41 (65,1)		0,012	346 (49,4)	213 (48,4)		0,310
	C/C	36 (21,6)	5 (7,9)	0,32 (0,12–0,86)		152 (21,7)	85 (19,3)	0,86 (0,64–1,15)	
Потребляющие недостаточно овощей и фруктов									
	Генотип/ аллель	ИМТ<25				ИМТ>25			
		Контроль (n=46)	Больные СД 2 (n=68)	ОШ* (95% ДИ)*	P*	Контроль (n=132)	Больные СД 2 (n=460)	ОШ* (95% ДИ)*	P*
rs2551715 (C>T)	C/C	12 (26,1)	22 (32,4)	1,00		40 (30,3)	158 (34,6)	1,00	
	C/T	24 (52,2)	33 (48,5)		0,970	70 (53,0)	216 (47,3)		0,80
	T/T	10 (21,7)	13 (19,1)	0,98 (0,37–2,56)		22 (16,7)	83 (18,2)	1,07 (0,64–1,80)	
rs2911678 (T>A)	T/T	21 (46,7)	32 (47,1)	1,00		72 (55,0)	235 (51,5)	1,00	
	T/A	17 (37,8)	30 (44,1)		0,320	49 (37,4)	190 (41,7)		0,89
	A/A	7 (15,6)	6 (8,8)	0,54 (0,16–1,80)		10 (7,6)	31 (6,8)	0,95 (0,45–2,00)	
rs3757918 (T>C)	T/T	15 (33,3)	16 (23,5)	1,00		44 (33,6)	135 (29,4)	1,00	
	T/C	18 (40,0)	38 (55,9)		0,360	58 (44,3)	220 (47,9)		0,76
	C/C	12 (26,7)	14 (20,6)	0,65 (0,26–1,64)		29 (22,1)	104 (22,7)	1,07 (0,67–1,72)	

Примечание. R – рецессивная модель; \*все расчеты выполнены с поправкой на пол и возраст.

$p=0,028$ ). Статистически значимых различий по генотипам локусов rs2911678 и rs3757918 не установлено ( $p>0,05$ ).

Принимая во внимание тот факт, что растительная пища служит источником экзогенных антиоксидантов, а изучаемый ген GSR непосредственно вовлечен в эндогенный ресинтез антиоксиданта глутатиона, нам представлялось важным провести оценку влияния потребления свежих овощей и фруктов на ассоциации полиморфизмов GSR с риском развития СД 2. Поскольку самым мощным фактором риска СД 2 является ожирение, анализ в подгруппах участников исследования с различным отношением к овощам и

фруктам проводили с учетом ИМТ. Все исследованные полиморфизмы GSR оказались значимо ассоциированы с пониженным риском развития СД 2 в подгруппе пациентов, ежедневно потребляющих достаточное количество овощей и фруктов и имеющих нормальную МТ (табл. 3). Так, генотип T/T rs2551715 в 2,5 раза реже отмечался у больных СД 2 по сравнению с контролем ( $p=0,008$ ); генотип A/A rs2911678 – в 6 раз ( $p=0,023$ ); генотип C/C rs3757918 – в 2,7 раза ( $p=0,012$ ). Примечательно, что у больных с нормальной МТ, не потребляющих ежедневно достаточно овощей и фруктов, ассоциация полиморфизмов гена GSR с



**Рис. 1. Сеть белков, образуемая GSR.**

*Примечание.* AIFM1 – апоптозиндуцирующий фактор 1, митохондриальный; CAT – каталаза; DBT – дигидролипоамид-ветвящая-трансацилаза, компонент E2; DLAT – идиголипоамид-S-ацетилтрансфераза; DLST – дигидролипоамид-S-сукцинилтрансфераза; PDHX – пируватдегидрогеназа, X-компонент; PRDX1 – пероксиредоксин 1; NME8 – тиоредоксин-доменсодержащий белок 3; NME9 – тиоредоксин-доменсодержащий белок 6; TXN – тиоредоксин.

**Fig. 1. Protein network formed by GSR.**

риском СД 2 не наблюдалась. Протективный эффект *GSR* в отношении риска СД 2 также нивелировался у пациентов с ИМТ>25, независимо от их отношения к свежим овощам и фруктам ( $p>0,05$ ).

Анализ гаметического неравновесия по сцеплению показал, что rs2551715 сцеплен с rs2911678 ( $D'=0,9014$ ,  $p<0,0001$ ), а rs2911678 сцеплен с rs3757918 ( $D'=0,9362$ ,  $p<0,0001$ ). Установлены следующие гаплотипы у больных СД 2: С-Т-Т (38,7%), Т-А-С (24,7%), С-Т-С (18,5%), Т-Т-Т (15,2%), порядок аллелей в которых соответствует полиморфизмам rs2551715-rs2911678-rs3757918. Анализ частот гаплотипов у больных и здоровых не выявил значимых различий ни в основных, ни дополнительных группах ( $p>0,05$ ).

Оценка редокс-статуса 588 участников исследования показала, что уровень  $H_2O_2$  в плазме 426 больных ( $3,60\pm 1,54$  мкмоль/л) был значительно выше такового в плазме 153 здоровых ( $2,88\pm 1,10$  мкмоль/л,  $p=0,0009$ ). Содержание окисленного глутатиона GSSG было также выше в группе пациентов с СД 2 ( $2,10\pm 1,70$  мкмоль/л) по сравнению с контролем ( $1,15\pm 0,76$  мкмоль/л,  $p=0,0008$ ). При анализе взаимосвязей между генотипами *GSR* и биохимическими показателями редокс-статуса больных СД 2 было обнаружено, что генотипы С/Т-Т/Т rs2551715 ассоциированы со снижением уровня  $H_2O_2$  в плазме на 0,32 мкмоль/л (95% ДИ -0,61—-0,02,  $p=0,039$ ), тогда как генотипы Т/А-А/А rs2911678 значимо ассоциированы со снижением концентрации GSSG на 0,45 мкмоль/л (95% ДИ -0,85—-0,06,  $p=0,024$ ).

Анализ взаимодействий *GSR* с другими генами на уровне белковых продуктов, выполненный с помощью инструмента STRING, показал, что глутатионредуктаза образует сеть из 10 белков (рис. 1), с 5 из которых фермент связан физически. Анализ обогащения терминами генов онтологий Gene

Ontology обнаружил, что 4 фермента – дигидролипоамид-S-ацетилтрансфераза (DLAT), пируватдегидрогеназа (PDHX), дигидролипоамид-S-сукцинилтрансфераза (DLST) и дигидролипоамид-ветвящая-трансацилаза (DBT) – обеспечивают метаболизм ацетил-коэнзима А – ацетил-КоА ( $p=3,06\times 10^{-6}$ ,  $FDR=8,06\times 10^{-3}$ ). Другие 6 белков сети: тиоредоксин (TXN), пероксиредоксин 1 (PRDX1), тиоредоксин-доменсодержащий белок 3 (NME8), тиоредоксин-доменсодержащий белок 6 (NME9), каталаза (CAT), митохондриальный апоптозиндуцирующий фактор 1 (AIFM1) совместно с *GSR* ответственны за катаболизм  $H_2O_2$  ( $p=1,42\times 10^{-4}$ ,  $FDR=4,89\times 10^{-2}$ ) и поддержание редокс-гомеостаза ( $p=1,01\times 10^{-9}$ ,  $FDR=1,59\times 10^{-5}$ ). Таким образом, с одной стороны, глутатионредуктаза получает от ферментов метаболизма ацетил-КоА восстановительные эквиваленты, необходимые для ресинтеза GSH из GSSG, а с другой – обеспечивает тиоредоксины и пероксиредоксины мономером глутатиона, способствуя снижению окислительной напряженности митохондриального матрикса.

Согласно данным GTEx Portal минорные аллели всех изучаемых SNPs связаны с увеличением экспрессии гена *GSR* в поджелудочной железе, нервной системе, подкожной и висцеральной жировой ткани. Те же аллели *GSR* усиливают экспрессию гена *UBXN8*, контролирующего деградацию продуктов неправильного фолдинга цитоплазматических белков, в подкожной жировой, нервной и скелетной мышечной ткани.

## Обсуждение

Глутатионредуктаза *GSR* – это регуляторный фермент антиоксидантной системы, главная функция которого заключается в поддержании внутриклеточного пула восстановленного глутатиона GSH. Только в форме мономера (GSH) глутатион способен осуществлять свои функции, включающие не только связывание активных форм кислорода и азота, канцерогенов, поллютантов, ксенобиотиков, но и секвестрирование, хранение, транспорт  $H_2O_2$  и цистеина, ассимиляцию серы, созревание железосерных кластеров различных белков, а также участие в регуляции редокс-сигнализации на уровне транскрипционных факторов. Глутатионредуктаза существует в виде двух изоформ, митохондриальной и цитозольной, и таким образом защищает все компартменты клетки от свободнорадикальных соединений [13].

Выполненное нами исследование в русской популяции выявило взаимосвязь трех полиморфизмов rs2551715, rs2911678, rs3757918 в интронах гена *GSR* с пониженным риском развития СД 2, тем самым впервые свидетельствуя о вовлеченности гена глутатионредуктазы в патогенез этого заболевания. В литературе имеются единичные исследования, посвященные изучению *GSR* при бронхиальной астме [14], ишемической болезни сердца [15] и гемолитической анемии [16]. Данные о связи *GSR* и СД 2 отсутствуют. Проведенный нами биоинформатический анализ установил, что минорные аллели всех трех SNPs гена глутатионредуктазы, включенных в исследование, увеличивают экспрессию *GSR* в поджелудочной железе, нервной системе, подкожной и висцеральной жировой ткани. В островках Лангерганса эти эффекты особенно важны ввиду низкой обеспеченности  $\beta$ -клеток антиоксидантами. Экспериментальные данные GTEx также свидетельствуют о коэкспрессии *GSR* с геном *UBXN8*, белковый продукт которого активирует разрушение продуктов несовершенного фолдинга белков в цитоплазме клеток и предотвращает сопряженный с избыточной генерацией активных форм кислорода стресс эндоплазматического ретикула. Кон-



центрация  $H_2O_2$  и окисленного глутатиона у больных СД 2 в нашем исследовании значимо превышала соответствующие показатели контрольной группы, что было описано ранее [17]. Положительный эффект альтернативных аллелей изучаемых вариантов *GSR* на редокс-баланс показан только в нашем исследовании: полиморфизм rs2551715 ассоциирован со снижением концентрации  $H_2O_2$  у больных СД 2, тогда как rs2911678 ассоциирован со снижением уровня окисленного глутатиона.

По всей видимости, ассоциация *GSR* с предрасположенностью к заболеванию модулируется внешними факторами: в нашем исследовании протективный эффект минорных аллелей изучаемых полиморфизмов *GSR* отмечен только у пациентов с нормальной МТ, ежедневно потребляющих не менее 6 порций свежих овощей и фруктов. Именно растительная пища служит природным источником витаминов и антиоксидантов, способным восполнить их эндогенный дефицит. Оценка связи потребления свежих овощей и фруктов с СД 2 по данным литературы неоднозначна. Так, P. Carter и соавт. [18] установили, что ежедневное потребление свежих овощей и фруктов снижает риск заболевания на 14%, тогда как H. Voeding и соавт. [19] исключили наличие прямой связи между количеством потребляемой растительной пищи и риском СД 2. A. Соорег и соавт. [20] рассчитали, что потребление свежих овощей, фруктов и их сочетаний снижает риск СД 2 на 25, 28 и 32% соответственно. Обратная связь между количеством растительной пищи и риском заболевания показана в исследовании I. Muraki и соавт. [21], включавшем 150 тыс. женщин и 35 тыс. мужчин, а также в метаанализе M. Li и соавт. [22]. В последнем рассчитано, что даже потребление 4 порций фруктов в день снижает риск развития СД 2 на 7%. Протективный в плане риска развития диабета эффект свежих овощей и фруктов может быть связан с тем, что, во-первых, флавоноид кверцетин, компонент растительной пищи, повышает экспрессию *GSR* и увеличивает активность фермента, что доказано в экспериментах на крысах [23] и человеческих клеточных линиях [24], а также стимулирует транслокацию транспортеров глюкозы-4 (GLUT4) к мембранам миоцитов и ингибирует глюкозо-6-фосфатазу в печени, способствуя нормализации гликемического профиля [25]. Во-вторых, показано, что кверцетин и полиоксифенолы растительной пищи активируют экспрессию редокс-чувствительного транскрипционного фактора Nrf2, запускающего транскрипцию ключевых антиоксидантных ферментов в ответ на активные формы кислорода и подавляющего провоспалительные эффекты ядерного транскрипционного фактора  $\kappa B$  [26].

Факт наличия протективных ассоциаций гена *GSR* в отношении риска СД 2 исключительно у пациентов с ИМТ < 25 подчеркивает возможность существования по крайней мере двух патогенетических вариантов заболевания. Первый характерен для лиц с нормальной МТ и включает нарушения секреции инсулина  $\beta$ -клетками при одновременном уменьшении их числа как главный механизм развития диабетической гипергликемии. В этих условиях

$\beta$ -клетки демонстрируют модуль экспрессии, соответствующий разным стадиям дедифференцировки [27]. Чувствительность тканей к инсулину у таких пациентов, как правило, сохранена. Вторым вариантом патогенеза наблюдается у больных с избыточной МТ или ожирением и включает как дисфункцию  $\beta$ -клеток, так и инсулинорезистентность. Существуют две точки зрения касательно последовательности возникновения этих патофизиологических феноменов. Согласно первой – несостоятельность инсулинпродуцирующего аппарата поджелудочной железы первична и именно гиперинсулинемия, а не гипергликемия вызывает инсулинорезистентность периферических тканей. В экспериментах на мышах [28] показано, что кормление жирной пищей приводит к гиперинсулинемии натощак уже на 3–4-й день при нормальной концентрации глюкозы. Кроме того, внутриклеточные медиаторы, например активные формы кислорода и длинноцепочечные жирные кислоты, также усиливают секрецию инсулина [29], что приводит к развитию белой жировой ткани, активации выброса из адипоцитов провоспалительных цитокинов, жировой инфильтрации печени и гиперпродукции триацилглицеролов, секретируемых печенью в кровь в виде липопротеинов очень низкой плотности. Согласно второй гипотезе инсулинорезистентность предшествует дисфункции  $\beta$ -клеток, выступая в качестве ее триггера и вызывая нарушение транслокации транспортеров глюкозы GLUT4 к мембране в скелетных миоцитах и адипоцитах, а также неспособность протеинкиназы B (Akt) ингибировать белок FOXO1, что, в свою очередь, активирует экспрессию ключевых ферментов глюконеогенеза и увеличивает продукцию глюкозы печенью [30].

## Заключение

Нами впервые установлена ассоциация полиморфизмов гена глутатионредуктазы с пониженным риском развития СД 2. Механизм взаимосвязи данных вариантов с заболеванием может объясняться более выраженным синтезом фермента у носителей минорных аллелей, что проявляется снижением концентрации  $H_2O_2$  и окисленного глутатиона в плазме крови. Данная ассоциация модулируется антиоксидантными эффектами внешней среды, а именно потреблением свежих овощей и фруктов, способствующим проявлению защитных эффектов полиморфных вариантов гена *GSR* в отношении риска развития заболевания.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interests.** The authors declare no conflict of interest.

**Источник финансирования.** Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №20-15-00227).

**Funding.** The study was supported by Russian Science Foundation (Project №20-15-00227)

## Список сокращений

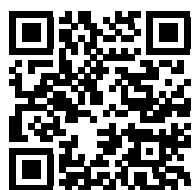
Ацетил-КоА – ацетил-коэнзим А  
ДИ – доверительный интервал  
ИМТ – индекс массы тела  
МТ – масса тела

ОШ – отношение шансов  
СД 2 – сахарный диабет 2-го типа  
 $H_2O_2$  – перекись водорода  
Me – медиана

## ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Cho NH, Shaw JE, Karuranga S, et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract.* 2018;138:271-81. DOI:10.1016/j.diabres.2018.02.023
2. Krentz NA, Gloyn AL. Insights into pancreatic islet cell dysfunction from type 2 diabetes mellitus genetics. *Nat Rev Endocrinol.* 2020;16(4):202-12. DOI:10.1038/s41574-020-0325-0
3. Newsholme P, Cruzat VF, Keane KN, et al. Molecular mechanisms of ROS production and oxidative stress in diabetes. *Biochem J.* 2016;473(24):4527-50. DOI:10.1042/BCJ20160503C
4. Malik VS, Popkin BM, Bray GA, et al. Sugar-sweetened beverages, obesity, type 2 diabetes mellitus, and cardiovascular disease risk. *Circulation.* 2010;121(11):1356-64. DOI:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.876185
5. Cederberg H, Stančáková A, Kuusisto J, et al. Family history of type 2 diabetes increases the risk of both obesity and its complications: is type 2 diabetes a disease of inappropriate lipid storage. *J Intern Med.* 2015;277(5):540-51. DOI:10.1111/joim.12289
6. Азарова Ю.Э., Клесова Е.Ю., Сакали С.Ю., Ковалев А.П. Вклад полиморфизма rs11927381 гена IGF2BP2 в патогенез сахарного диабета 2 типа. *Научные результаты биомедицинских исследований.* 2020;6(1):9-19 [Azarova IE, Klyosova EYu, Sakali SYu, Kovalev AP. Contribution of rs11927381 polymorphism of the IGF2BP2 gene to the pathogenesis of type 2 diabetes. *Nauchnye rezultaty biomeditsinskikh issledovaniy.* 2020;6(1):9-19 (in Russian)]. DOI:10.18413/2658-6533-2020-6-1-0-2
7. Азарова Ю.Э., Клесова Е.Ю., Самгина Т.А., и др. Роль полиморфных вариантов гена СУВА в патогенезе сахарного диабета 2 типа. *Медицинская генетика.* 2019;18(8):37-48 [Azarova YuE, Klyosova EYu, Samgina TA, et al. Role of cyba gene polymorphisms in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Meditsinskaiia genetika.* 2019;18(8):37-48 (in Russian)]. DOI:10.25557/2073-7998.2019.08.37-48
8. World Health Organization. Global report on diabetes: executive summary (№WHO/NMH/NVI/16.3). World Health Organization, 2016. Available at: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/204874>. Accessed: 17.05.2020.
9. SNPStats [updated 2018; cited 2019 June 13]. Available at: <https://www.snpstats.net>. Accessed: 17.05.2020.
10. GTex Portal [updated 2019; cited 2019 June 13]. Available at: [www.gtexportal.org](http://www.gtexportal.org). Accessed: 17.05.2020.
11. STRING [updated 2019; cited 2019 June 13]. Available at: <https://string-db.org>. Accessed: 17.05.2020.
12. Gene Ontology [updated 2019 June 9; cited 2019 June 13]. Available at: <http://geneontology.org>. Accessed: 17.05.2020.
13. García-Giménez JL, Pallardó FV. Maintenance of glutathione levels and its importance in epigenetic regulation. *Front Pharmacol.* 2014(5):88. DOI:10.3389/fphar.2014.00088
14. Polonikov AV, Ivanov VP, Bogomazov AD, et al. Antioxidant defense enzyme genes and asthma susceptibility: gender-specific effects and heterogeneity in gene-gene interactions between pathogenetic variants of the disease. *Biomed Res Int.* 2014;2014:708903. DOI:10.1155/2014/708903
15. Lubrano V, Balzan S. Enzymatic antioxidant system in vascular inflammation and coronary artery disease. *World J Exp Med.* 2015;5(4):218-24. DOI:10.5493/wjem.v5.i4.218
16. Lindbergh E. Hemolytic anemia in disorders of red cell metabolism. Springer Science and Business Media, 2012.
17. Lagman M, Ly J, Saing T, et al. Investigating the causes for decreased levels of glutathione in individuals with type II diabetes. *PLoS One.* 2015;10(3):e0118436. DOI:10.1371/journal.pone.0118436
18. Carter P, Gray LJ, Troughton J, et al. Fruit and vegetable intake and incidence of type 2 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis. *BMJ.* 2010;341:c4229. DOI:10.1136/bmj.c4229
19. Boeing H, Bechthold A, Bub A, et al. Critical review: vegetables and fruit in the prevention of chronic diseases. *Eur J Nutr.* 2012;51(6):637-63. DOI:10.1007/s00394-012-0380-y
20. Cooper AJ, Sharp SJ, Lentjes MA, et al. A prospective study of the association between quantity and variety of fruit and vegetable intake and incident type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2012;35(6):1293-300. DOI:10.2337/dc11-2388
21. Muraki I, Imamura F, Manson JE, et al. Fruit consumption and risk of type 2 diabetes: results from three prospective longitudinal cohort studies. *BMJ.* 2013;347:f5001. DOI:10.1136/bmj.f5001
22. Li M, Fan Y, Zhang X, et al. Fruit and vegetable intake and risk of type 2 diabetes mellitus: meta-analysis of prospective cohort studies. *BMJ Open.* 2014;4(11):e005497. DOI:10.1136/bmjopen-2014-005497
23. González-Esquivel AE, Charles-Niño CL, Pacheco-Moisés FP, et al. Beneficial effects of quercetin on oxidative stress in liver and kidney induced by titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles in rats. *Toxicol mech methods.* 2015;25(3):166-75. DOI:10.3109/15376516.2015.1006491
24. Granado-Serrano AB, Martín MA, Bravo L, et al. Quercetin modulates Nrf2 and glutathione-related defenses in HepG2 cells: Involvement of p38. *Chem Biol Interact.* 2012;195(2):154-64. DOI:10.1016/j.cbi.2011.12.005
25. Xu L, Li Y, Dai Y, Peng J. Natural products for the treatment of type 2 diabetes mellitus: Pharmacology and mechanisms. *Pharmacol Res.* 2018;130:451-65. DOI:10.1016/j.phrs.2018.01.015
26. Cardozo LF, Pedruzzi LM, Stenvinkel P, et al. Nutritional strategies to modulate inflammation and oxidative stress pathways via activation of the master antioxidant switch Nrf2. *Biochimie.* 2013;95(8):1525-33. DOI:10.1016/j.biochi.2013.04.012
27. Axelsson AS, Mahdi T, Nenonen HA, et al. Sox5 regulates beta-cell phenotype and is reduced in type 2 diabetes. *Nat Commun.* 2017;8:15652. DOI:10.1038/ncomms15652
28. Turner N, Kowalski GM, Leslie SJ, et al. Distinct patterns of tissue-specific lipid accumulation during the induction of insulin resistance in mice by high-fat feeding. *Diabetologia.* 2013;56(7):1638-48. DOI:10.1007/s00125-013-2913-1
29. Corkey BE. Diabetes: Have we got it all wrong? Insulin hypersecretion and food additives: cause of obesity and diabetes? *Diabetes Care.* 2016;35(12):2432-7. DOI:10.2337/dc12-0825
30. Czech MP. Insulin action and resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nat Med.* 2017;23(7):804-14. DOI:10.1038/nm.4350

Статья поступила в редакцию / The article received: 11.06.2020



OMNIDOCTOR.RU