

DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-159-11-24-32

Исследование полиморфизма гена PNPLA3 у пациентов с неалкогольной жировой болезнью печени и различной стадией фиброза

Кролевец Т.С., Ливзан М.А., Ахмедов В.А., Новиков Д.Г.

Федеральное государственное образовательное учреждение высшего образования «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Омск, 644099, Россия

Study of PNPLA3 gene polymorphism in patients with non-alcoholic fatty liver disease and various stages of fibrosis

T.S. Krolevets, M.A. Livzan, V.A. Akhmedov, D.G. Novikov

Federal State Educational Establishment of Higher Education "Omsk State Medical University" of the Ministry of Health of the Russian Federation, Omsk, 644099, Russia

Для цитирования: Кролевец Т.С., Ливзан М.А., Ахмедов В.А., Новиков Д.Г. Исследование полиморфизма гена PNPLA3 у пациентов с неалкогольной жировой болезнью печени и различной стадией фиброза. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2018;159(11): 24–32. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-159-11-24-32

For citation: Krolevets T.S., Livzan M.A., Akhmedov V.A., Novikov D.G. Study of PNPLA3 gene polymorphism in patients with non-alcoholic fatty liver disease and various stages of fibrosis. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2018;159(11): 24–32. (In Russ.) DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-159-11-24-32

✉ **Corresponding author:**

Ахмедов Вадим Адильевич
Vadim A. Akhmedov
v_akhmedov@mail.ru

Кролевец Татьяна Сергеевна, аспирант кафедры факультетской терапии с курсом профессиональных болезней, ORCID — 0000–0002–7452–7230

Ливзан Мария Анатольевна, д.м.н., профессор, заведующая кафедрой факультетской терапии с курсом профессиональных болезней, ORCID — 0000–0002–6581–7017

Ахмедов Вадим Адильевич, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой медицинской реабилитации дополнительного профессионального образования

Новиков Дмитрий Георгиевич, заведующий центральной научно-исследовательской лабораторией

Tatiana S. Krolevets, Department of Faculty Therapy, Occupational Diseases, ORCID — 0000–0002–7452–7230, Scopus Author ID: 56848263100

Mariya A. Livzan, Department of Faculty Therapy, Occupational Diseases, ORCID — 0000–0002–6581–7017, Scopus Author ID: 24341682600

Vadim A. Akhmedov, MD, Ph.D. Dr. Sci. Professor, Head of Medical Rehabilitation Department of Continuing Professional Education, ORCID 0000-0002-7603-8481; Scopus Author ID: 6603891660

Dmitri G. Novikov, Department of Faculty Therapy, Occupational Diseases

Резюме

Цель исследования — оценить диагностическую значимость полиморфизма rs738409 C>G гена PNPLA3 в качестве маркера формирования и прогрессирования фиброза печени у пациентов с неалкогольной жировой болезнью (НАЖБП).

Материалы и методы. Проведено открытое исследование типа «случай-контроль» группы пациентов с неалкогольной жировой болезнью печени в количестве 35 человек. Проводились общеклинические, лабораторные методы обследования. Дополнительно исследовались неинвазивные маркеры фиброза в сыворотке крови: концентрации инсулина, лептина, адипонектина, матриксной металлопротеиназы-9 (ММП-9) и её ингибиторов — тканевого ингибитора матриксной металлопротеиназы-1 и 2 (ТИМП-1, ТИМП-2). Всем пациентам проводилась эластометрия печени для оценки стадии фиброза по шкале Metavir с помощью аппарата «Фиброскан» (FibroScan). В качестве потенциального маркера прогрессирования фиброза печени при НАЖБП исследовался полиморфизм PNPLA3 148M/I (rs738409) методом ПЦР.

Результаты. Имеются клинические признаки, позволяющие говорить о большей выраженности стеатоза печени у носителей G-аллеля гена PNPLA3 148M/I. Для больных НАЖБП с генотипом C/G PNPLA3 148M/I характерно более агрессивное течение заболевания с формированием высоких прогрессирующих стадий фиброза.

Заключение. Полиморфизм PNPLA3 148M/I может рассматриваться как неинвазивный маркер, отражающий формирование и прогрессирование фиброзных изменений в ткани печени у пациентов с НАЖБП.

Ключевые слова: Неалкогольная жировая болезнь печени, фиброз, неинвазивные маркеры, полиморфизм rs738409 PNPLA3

Summary

The aim of the study was to evaluate the diagnostic significance of the rs738409 C> G polymorphism of the PNPLA3 gene as a marker for the formation and progression of liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty disease (NAFLD).

Materials and methods. An open case-control study of a group of patients with non-alcoholic fatty liver disease in the amount of 35 people was conducted. Conducted clinical, laboratory examination methods. Additionally, non-invasive serum fibrosis markers were studied: concentrations of insulin, leptin, adiponectin, matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and its inhibitors — tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 and 2 (TIMP-1, TIMP-2). All patients underwent liver elastometry to assess the stage of fibrosis on the Metavir scale using the FibroScan apparatus (FibroScan). As a potential marker for the progression of liver fibrosis in NAFLD, PNPLA3 148M / I polymorphism (rs738409) was studied by PCR.

Results. There are clinical signs that suggest that liver steatosis is more pronounced in carriers of the G allele of the PNPLA3 148M / I gene. For patients with NAFLD C / G PNPLA3 148M / I genotype, a more aggressive course of the disease with the formation of high progressive stages of fibrosis is characteristic.

Conclusion. PNPLA3 148M / I polymorphism can be considered as a non-invasive marker reflecting the formation and progression of fibrotic changes in the liver tissue in patients with NAFLD.

Keywords: Non-alcoholic fatty liver disease, fibrosis, non-invasive markers, rs738409 PNPLA3 polymorphism

Введение

Неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП) занимает одну из лидирующих позиций среди диффузных заболеваний печени [1]. Актуальность изучения НАЖБП обусловлена как распространенностью заболевания, так и увеличением риска сердечно-сосудистых осложнений, развитием цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК). Доля пациентов с НАЖБП среди взрослого населения составляет от 6,3% до 33% с медианой 20% в общей мировой популяции. В некоторых западных странах распространенность заболевания достигает 46% [2,3]. У больных с НАЖБП установлена более высокая распространенность сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ), чем у пациентов без НАЖБП вне зависимости от тучности и традиционных факторов риска ССЗ [4]. Прогрессирование заболевания также увеличивает риск формирования цирроза печени и печеночной недостаточности [5]. В зарубежных исследованиях было показано, что у четверти (27%) пациентов с НАЖБП в течение 9 лет развивается фиброз, у каждого пятого (19%) – цирроз различной степени выраженности [6, 7, 8]. По данным российского эпидемиологического исследования-наблюдения DIREG L 01903 от 2007 года распространенность НАЖБП среди взрослого населения РФ составила 27%, в том числе 80,3% случаев приходилось на стеатоз печени, 16,8% – на неалкогольный стеатогепатит (НАСГ) и 2,9% – на цирроз печени [9]. Исследование DIREG2 в 2015 году показало, что распространенность НАЖБП среди российских пациентов составила уже 37,3%, показав рост на 10% за 7 лет, при этом число больных с циррозом печени в исходе НАЖБП увеличилось до 5% [10]. Установлено, что стадия фиброза, а не выраженность воспаления, является тем прогностическим фактором, который определяет дальнейшую выживаемость пациентов и развитие осложнений [11]. В этой связи важным становится поиск предиктора

прогрессирования фиброза печени для индивидуализации терапии и дальнейшего наблюдения пациента.

На современном этапе развития персонализированной медицины представляется интересным изучение полиморфизмов генов в развитии или прогрессировании заболеваний. Так, в 2008 г. S. Romeo и соавт. [12] при помощи метода сканирования ассоциации генома (genome-wide scans – GWAS) впервые сообщили о полиморфизме гена PNPLA3/148M (patatin-like phospholipase domain-containing 3 PNPLA3 – пататин-подобный домен, содержащий 3 фосфолипазу) в хромосоме 22q13. Данный полиморфизм означает замену С на G, что ведет за собой замену изолейцина в метионин в положении 148 белка и имеет еще одно название «адипонутрин». Адипонутрин кодирует белок, состоящий из 481 аминокислоты, ответственной за функцию эндоплазматического ретикулума, структуру и функцию мембран митохондрий и липидных включений в гепатоцитах и мембран адипоцитов. Ген PNPLA3/148M, взаимодействуя с геном – регулятором липогенеза (SREBP-1c) [13], способствует изменению липидного катаболизма и снижению синтеза фосфолипидов, в частности фосфатидилхолина [14, 15]. В исследованиях продемонстрировано [16], что G-аллель гена PNPLA3 положительно коррелирует с содержанием триглицеридов в ткани печени, а потеря его активности может быть непосредственно связана с воспалением в печеночной ткани. Относительно ассоциации PNPLA3 с развитием и прогрессированием фиброза печени при гистологически подтвержденной НАЖБП, независимо от ожирения, сахарного диабета и стеатоза, были также представлены убедительные данные [17]. Доказано участие данного гена в формировании цирроза печени и трансформации в ГЦК [18, 19], независимо от внешних факторов (ожирения, употребления алкоголя). Полиморфизм гена PNPLA3/148M на сегодняшний

день представляется независимым генетическим фактором развития и прогрессирования НАЖБП и неалкогольного стеатогепатита (НАСГ), что прозвучало в 2017 году на европейской гастронеделе в Чикаго. Представляется интересным изучение данного полиморфизма на российской популяции.

Материалы и методы

Для достижения поставленной цели нами было проведено открытое исследование типа «случай-контроль» с формированием когорты из 35 пациентов с НАЖБП и различной стадией фиброза печени.

Критериями включения в исследование были: возраст от 18 до 65 лет, наличие НАЖБП с различной степенью фиброза, подписанное информированное согласие. Критериями исключения – подозрение на алкогольную или наркотическую зависимость, лекарственное, вирусное, аутоиммунное поражение печени, болезни накопления, цирроз печени, онкологические заболевания, тяжелые заболевания (некорригированная артериальная гипертензия (АГ), СД 2 типа в стадии декомпенсации, хроническая сердечная недостаточность (ХСН) III–IV функционального класса, перенесенные инфаркты, инсульты), беременность, период лактации и низкая комплаентность.

Всем пациентам, включенным в исследование, осуществлялся сбор жалоб, анамнеза жизни с целенаправленным расспросом об образе жизни, лекарственном анамнезе, о наличии заболеваний, ассоциированных с метаболическим синдромом (МС). Проводились обследования, включавшие общеклинические (антропометрия с подсчетом ИМТ, измерения объема талии (ОТ) и бедер (ОБ) и подсчетом отношения ОТ к ОБ (ОТ/ОБ), осмотр кожного покрова, исследование органов брюшной полости), лабораторные (общие анализы крови и мочи, определение глюкозы плазмы крови натощак, уровня общего белка, билирубина, АлАТ, АсАТ, ЩФ, ГГТ, общего холестерина и его фракций) и инструментальные (ультразвуковое исследование брюшной полости) методы. Дополнительно проводилась оценка гормонального статуса, измерение сывороточных показателей инсулина, лептина, адипонектина, и прямых неинвазивных маркеров фиброза печени, матриксной металлопротеиназы-9 (ММП-9), а также её ингибиторов – тканевого ингибитора матриксной металлопротеиназы-1 и 2

Цель исследования: оценить диагностическую значимость полиморфизма rs738409 C>G гена PNPLA3 в качестве маркера формирования и прогрессирования фиброза печени у пациентов с неалкогольной жировой болезнью (НАЖБП).

(ТИМП-1, ТИМП-2). Всем лицам, включенным в исследование, проводилась эластометрия печени для оценки степени фиброза по шкале Metavir с помощью аппарата «Фиброскан» (FibroScan) на базе БУЗОО ГК ИБ № 1 г.Омска.

В качестве потенциальных маркеров прогрессирования фиброза печени при НАЖБП и персонализации дальнейшего наблюдения всем пациентам проводилась оценка полиморфизма PNPLA3 (Patatin-Like Phospholipase Domain Containing 3) 148M/I (rs738409) с помощью набора реагентов TaqMan SNP Genotyping Assay (C_7241_10) для генотипирования полиморфизма rs738409 гена PNPLA3, смеси реагентов TaqMan Genotyping Master Mix для проведения ПЦР на оборудовании: амплификатор Rotor-Gene 6000 «Corbett Research», (Австралия). Все лабораторные исследования проводились в Академическом центре лабораторной диагностики (АЦЛД) Омского государственного медицинского университета.

Обработка результатов исследования и графический анализ данных проводились на персональном компьютере при помощи программ Microsoft Excel, STATISTICA 6.1 (русифицированная версия). В виду того, что распределение показателей в группах было отличным от нормального, данные представлены в виде медианы (с указанием межквартильного размаха). Сравнение выборок проводили при помощи непараметрических критериев: критерий Mann-Whitney для количественных данных, для качественных данных – таблицы сопряженности (χ^2 Пирсона). Взаимосвязи между показателями оценивались при помощи корреляционного анализа Спирмена (rs). Сила связи между признаками при значениях коэффициентов корреляции от 0,0 до -0,25 и до +0,25 оценивалась как отсутствие или слабая; от 0,26 до 0,5 (от -0,26 до -0,5) – как умеренная; от 0,51 до 0,75 (от -0,5 до -0,75) – как средняя; более 0,75 (-0,75) – как сильная. На всех этапах статистического анализа нулевая гипотеза отвергалась при значениях p меньше 0,05.

Результаты и их обсуждение

Пациенты с НАЖБП были представлены лицами мужского пола (24 человек или 68,57%) и женского пола (11 человек, 31,43%) среднего трудоспособного возраста (медиана возраста 45 лет с межквартильным размахом 41–58 лет).

Нормальные гомозиготы C/C в исследуемой когорте пациентов встречались в 13 случаях (37,14%), гетерозиготы C/G встречались в 22 (62,86%) случаях, соответственно. Мутантных гетерозигот по G аллелю в представленной группе пациентов не

встречалось, в связи с чем пациенты с НАЖБП были нами разделены на 2 группы: 1 группа – гомозиготы по C аллелю ($n=13$) и 2 группа – гетерозиготы C/G ($n=22$).

Пациенты в исследуемых группах были сравнимы по полу и возрасту. Распределение по полу наглядно представлено в *таблице 1*, по возрасту – в *таблице 2*.

По результатам опроса у 14 пациентов (40%) было отмечено бессимптомное течение заболевания, что

Пол	Группа 1 (n=13)		Группа 2 (n=22)		X ²	p
	чел	%	чел	%		
Мужчины	8	61,54	17	73,91	0,599	>0,05
Женщины	5	38,46	6	26,09		

Возраст, лет	Группа 1 (n=13)		Группа 2 (n=22)		Z	p
	чел	%	чел	%		
18–29	0	0	0	0	0,615	>0,05
30–39	1	7,69	5	22,72		
40–49	6	46,15	8	36,36		
50–59	4	30,77	3	13,64		
60 лет и старше*	2	15,38	6	27,27		
Всего	13	100	22	100		

Жалобы	Интенсивность	Группа 1 (n=13)		Группа 2 (n=22)		X ²	p
		чел	%	чел	%		
Боль в правом подреберье	0	9	69,23	15	68,18	0,199	>0,05
	1	2	15,38	4	18,18		
	2	1	7,69	2	9,09		
	3	1	7,69	1	4,55		
Дискомфорт в правом подреберье	0	7	53,85	18	81,82	3,214	>0,05
	1	4	30,77	3	13,64		
	2	2	15,38	1	4,55		
	3	0	0	0	0		
Горечь во рту	0	10	76,92	19	86,36	1,227	>0,05
	1	2	15,38	1	4,55		
	2	1	7,69	2	9,09		
	3	0	0	0	0		
Общая слабость	0	12	92,31	19	86,36	1,356	>0,05
	1	1	7,69	1	4,55		
	2	0	0	2	9,09		
	3	0	0	0	0		
Утомляемость	0	12	92,31	19	86,36	1,356	>0,05
	1	1	7,69	1	4,55		
	2	0	0	2	9,09		
		3	0	0	0		

согласуется с литературными данными [20]. Пациенты с НАЖБП преимущественно предъявляли жалобы со стороны правого подреберья в виде боли (11 человек, 31,43%) или дискомфорта (10 человек, 28,57%), что может быть обусловлено как увеличением печени (tunica fibrosa hepatis), фиброзной оболочки, имеющей рецепторы боли на своей поверхности, так и органическими и функциональными заболеваниями билиарного тракта (желчнокаменной болезнью, дисфункцией сфинктера Одди), частота которых вследствие нарушения энтерогепатической циркуляции и функции гепатоцитов возрастает у пациентов с НАЖБП [21]. Неспецифические жалобы в виде общей слабости и утомляемости предъявляли 4 пациента (11,43%), 6 пациентов (17,14%) – на горечь во рту. Среди жалобы со стороны верхних отделов пищеварительного тракта: боли и дискомфорт в эпигастральной области зафиксированы у 5 пациентов (14,29%), симптомы регургитации (изжога и отрыжка воздухом или

Таблица 1.

Распределение по полу в группах сравнения (1–2). Сравнение с помощью таблиц сопряженности (X² Пирсона).

Примечание:

n – количество пациентов в каждой группе, p – достоверность различий, >0,05 – различия статистически незначимы.

Table 1.

Gender distribution in comparison groups (1–2). Comparison using contingency tables (Pearson's X²).

Note:

n – number of patients in each group, p – reliability differences, >0.05 – differences are statistically insignificant.

Таблица 2.

Распределение пациентов по возрасту в группах сравнения (1–2). Сравнение методом Mann-Whitney.

Примечание:

n – количество пациентов в каждой группе,

p – достоверность различий,

>0,05 – различия статистически незначимы,

* – согласно критериям включения возраст ограничен 65 годами.

Table 2.

Age distribution of patients in comparison groups (1–2). Comparison by Mann-Whitney method.

Note:

n – number of patients in each group, p – significance of differences, >0.05 – differences are not statistically significant, * – according to the inclusion criteria, the age is limited to 65 years.

Таблица 3.

Жалобы в группах сравнения (1–2). Сравнение с помощью таблиц сопряженности (X² Пирсона).

Примечание:

n – количество пациентов в каждой группе, p – достоверность различий, >0,05 – различия статистически незначимы.

Table 3.

Complaints in comparison groups (1–2). Comparison with contingency tables (Pearson's X²).

Note:

n – number of patients in each group, p – reliability differences, >0.05 – differences are statistically insignificant.

кислым содержимым) – у 11 (31,43%) и 4 пациентов (11,43%), соответственно, что может быть связано с высокой распространенностью у пациентов с факторами риска НАЖБП гастроэзофагеальной рефлюксной болезни [22]. В группах сравнения статистически достоверных различий по частоте и интенсивности основных жалоб не было (таблица 3). Наличие G аллеля не оказывало влияния на клинические субъективные проявления заболевания по данным корреляционного анализа.

Давность заболевания по результатам просмотра амбулаторных карт у пациентов групп сравнения была различной. Диагноз НАЖБП был зафиксирован нами впервые 5 пациентам или 14,29%, у остальных давность варьировала от минимального 1 месяца до максимального – 144 месяца или 12 лет. Медиана продолжительности болезни в целом по группе составила 5 месяцев, нижний и верхний квартили 1 и 24 месяца, соответственно. В группе 1 давность заболевания составила 12 месяцев с межквартильным размахом 5 и 25

Диаграмма 1.

Распространенность сопутствующих заболеваний в группе 1 (гомозиготы).

Figure 1.
Prevalence of comorbidities in group 1 (homozygotes).

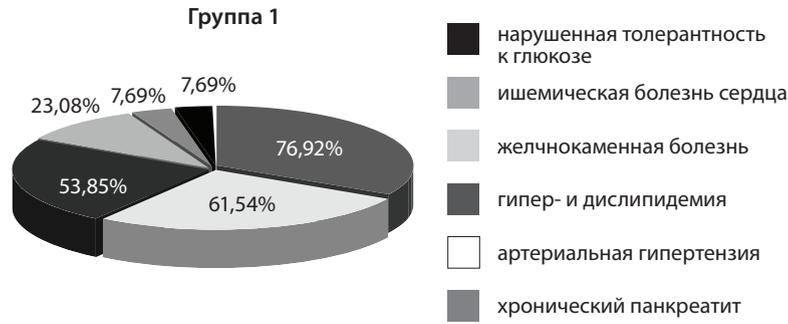


Диаграмма 2.

Распространенность сопутствующих заболеваний в группе 2 (гетерозиготы).

Figure 2.
Prevalence of comorbidities in group 2 (heterozygotes).

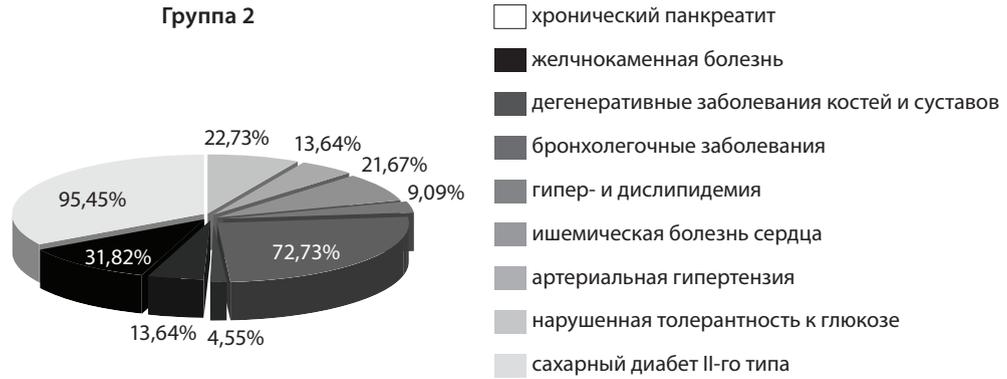


Таблица 4.

Морфометрическая характеристика в группах сравнения (1–2). Сравнение методом Mann-Whitney.

Примечание:

n – количество пациентов, P50 – медиана, P25 – верхний квартиль, P75 – нижний квартиль, ОТ/ОБ – отношение объема талии к объему бедер.

Table 4.

Morphometric characteristics in groups comparisons (1-2). Comparison method Mann-Whitney.

Note:

n-number of patients, P50-median, P25-upper quartile, P75-lower quartile, WV / HV – relative- waist volume to volume of hips.

Показатель	Группа 1 (n=13)						Группа 2 (n=22)						Z	p
	мужчины			женщины			мужчины			женщины				
	P50	P25	P75	P50	P25	P75	P50	P25	P75	P50	P25	P75		
Рост, см	172,50	168,00	182,00	169,00	166,00	172,00	176,00	172,00	182,00	156,50	152,00	162,50	-0,689	0,49
Масса тела, кг	95,00	86,00	103,00	97,00	88,00	106,00	103,00	93,00	113,00	98,00	92,00	99,50	-0,787	0,43
Индекс массы тела Кетле, кг/м ²	30,94	29,77	33,66	34,11	29,75	38,47	31,60	30,61	35,02	37,68	37,39	40,12	-0,762	0,45
Объем талии, см	109,00	106,00	113,00	94,00	94,00	94,00	107,50	105,00	110,00	109,00	104,00	121,00	-0,526	0,60
Объем бедер, см	103,00	102,00	109,00	104,00	104,00	104,00	100,00	97,00	107,00	108,00	82,00	115,00	0,307	0,76
ОТ/ОБ	1,02	1,01	1,04	0,90	0,90	0,90	1,04	1,03	1,06	1,05	1,01	1,27	-1,535	0,12

Таблица 5.

Результаты физического осмотра в группах сравнения (1–2). Сравнение с помощью таблиц сопряженности (X² Пирсона).

Примечание:

n – количество пациентов в каждой группе, p – достоверность различий, >0,05 – различия статистически незначимы, <0,05 – различия статистически значимы.

Table 5.

Physical examination results in compared groups (1-2). Comparison using contingency tables (Pearson's X²).

Note:

n-number of patients in each group, p-significance of differences, >0,05 – differences are statistically insignificant, <0,05 – differences statistically significant.

Данные осмотра	Группа 1 (n=13)		Группа 2 (n=22)		X ²	p
	чел	%	чел	%		
Ксантелазмы	0	0	2	9,09	1,253	>0,05
Рубиновые пятна	5	38,46	14	63,64	2,087	>0,05
Боль в эпигастрии	9	69,23	16	72,73	0,049	>0,05
Боль в правом подреберье	10	76,92	20	90,91	1,305	>0,05
Боль в левом подреберье	0	0	2	9,09	1,253	>0,05
Увеличение печени	1	7,69	14	63,64	10,443	<0,05
Симптомы ЖП	8	61,54	12	54,55	0,163	>0,05

месяцев, в группе 2–12 (3–36) месяцев, соответственно. Достоверных различий по указанному признаку в группах не наблюдалось.

Распространенность сопутствующих заболеваний, ассоциированных с метаболическим синдромом, характеризующих патологию желчного пузыря и поджелудочной железы, в группах сравнения представлена на диаграмме 1 и диаграмме 2.

По распространенности сопутствующей патологии в группах достоверно значимых различий обнаружено не было, но по данным корреляционного анализа нами была обнаружена тенденция к более высокой распространенности сахарного диабета у пациентов – носителей G аллеля. Связь между признаками была средней силы, но не достигла статистической значимости (rs=(0,314), p<0,07).

Морфометрическая характеристика пациентов групп сравнения в зависимости от пола представлена на *таблице 4*.

Различий и/или взаимосвязей морфометрических данных с наличием G – аллеля в группах сравнения обнаружено не было. Пациентов с нормальной массой тела в группах сравнения не было. Медиана ИМТ, кг/м² в группе 1 составила 31,21, межквартильных размах 29,77–34,72, в группе 2–33,24 с размахом 31,06–37,22, соответственно. В группах сравнения по 3 пациента (23,08% среди гомозигот и 13,64% среди гетерозигот) имели избыточную массу тела, остальные страдали ожирением различной степени. По данным расчета объема талии, объема бедер и их отношения (ОТ/ОБ) распределение жировой массы в группах сравнения у мужчин и у женщин соответствовало абдоминальному. Медиана ОТ/ОБ в группе 1 составила 1,02 с межквартильным размахом 1,0–1,04, в группе 2–1,04 и 1,03–1,06, соответственно.

Данные физикального осмотра среди пациентов групп сравнения представлены в *таблице 5*.

Как видно из представленной таблицы, у носителей G-аллеля гена PNPLA3 по данным осмотра и пальпации увеличение печени встречалось достоверно более часто. Данные признаки также имели значимую положительную взаимосвязь средней силы ($rs=(0,546)$, $p<0,0007$). Известно, что увеличение размеров печени, наблюдаемое при НАЖБП, обусловлено напрямую отложением жировых капель и замещением в последующем гепатоцитов жировой тканью. Как показали результаты зарубежных исследований, адипонутрин был ассоциирован с нарушениями липидного обмена (гипертриглицеремией) у пациентов с НАЖБП и как следствие, выраженностью стеатоза [23].

Уровень систолического и диастолического давления, пульса в группе 1 составил 130 (120–138) мм рт.ст., 70 (60–85) уд/мин, соответственно, в группе 2–120 (110–130) мм рт.ст., 62 (60–80) уд/мин, соответственно. По данным показателям различий среди гомо- и гетерозигот не отмечалось.

Результаты и сравнение данных рутинных лабораторных исследований в группах представлены в *таблице 6*. Отклонений в общем анализе крови не выявлено.

НАЖБП в стадии стеатоза была диагностирована у 12 пациентов (34,29%). Клинико-биохимическая активность заболевания была отмечена у 23 (65,71%) пациента, при этом цитолиз (подъем АЛТ и АСТ) был диагностирован у 8 (34,78%), холестаз (подъем ГГТ и ЩФ) – у 7 (30,43%) и смешанные нарушения (цитолиз и холестаз) – у 8 (34,78%) респондентов. Биохимическая активность у данных пациентов не превышала 2 стадии, что в свою очередь, не могло повлиять на дальнейшую оценку стадии фиброза с помощью эластометрии. Дополнительно рассчитываемый коэффициент отношения АЛТ к АСТ (АЛТ/АСТ) был более 1 у всех обследуемых (1,46 (1,14–1,76)). По данным корреляционного анализа генотип PNPLA3 не был ассоциирован с биохимической активностью заболевания. Подъем ГГТ и ЩФ не был ассоциирован с наличием у пациентов заболеваний гепатобилиарного тракта ($rs=(-0,178)$, $p<0,215$ – корреляции с ЩФ, $rs=(0,070)$, $p<0,590$ – кор-

реляции с ГГТ), которые также могут проявляться синдромом холестаза (желчнокаменная болезнь, функциональные расстройства сфинктера Одди). Подъем функциональных проб печени также может быть ассоциирован с приемом сопутствующей лекарственной терапией, а именно с приемом статинов. Однако при проведении корреляционного анализа нами было установлено, что у обследуемых лиц с НАЖБП прием статинов не повышал риск формирования ее прогрессирующих стадий, стеатогепатита ($rs=(-0,127)$, $p<0,122$ – корреляции со стадией НАЖБП, $rs=(0,049)$, $p<0,558$ – с подъемом АЛТ).

У некоторых пациентов отмечался подъем уровня глюкозы натощак, чаще у лиц с ранее диагностированным нарушениями углеводного обмена, но в целом по группе медиана глюкоза составила 5,4 ммоль/л с межквартильным размахом 4,9 и 5,7 ммоль/л. У обследуемых лиц были диагностированы нарушения липидного обмена: гиперхолестеремия (уровень общего холестерина составил 5,4 (4,7–6,05) ммоль/л), дислипидемия (уровни ЛПНП и ЛПВП – 3,8 (2,89–4,51) и 1,12 (0,99–1,23) ммоль/л, соответственно), гипертриглицеридемия (уровень триглицеридов 2,31 (1,74–2,73) ммоль/л). По остальным показателям патологических изменений в биохимическом анализе крови в целом выявлено не было. Как видно из представленной *таблицы 6* достоверно значимых различий по основным лабораторным показателям в группах сравнения обнаружено не было, также, как и ассоциаций с G-аллелем.

Обращает на себя внимание тенденция к более низким значениям общего белка у гетерозигот, носителей G-аллеля. Как известно, белковосинтетическая функция одна из самых важных в печени. При снижении функциональных возможностей печеночной ткани снижение уровня альбуминов и общего белка, соответственно, лежит в основе формирования отечно-асцитического синдрома у пациентов терминальных стадий поражения печени, цирроза. Таким образом, снижение общего белка у гетерозигот может косвенно говорить о более тяжелом течении заболевания, НАЖБП, у данной категории больных.

Нами была проведена дополнительная оценка независимых прямых маркеров фиброза печени и гормонального профиля у пациентов с НАЖБП. Было обнаружено увеличение ТИМР-1 в исследуемой когорте и составило 1505 (1420–1650) нг/мл, что превышает референтные значения более, чем в 3 раза. Уровни ММР-9 и ТИМР-2 были в пределах нормы и составили 530 (304–768) нг/мл и 111,75 (84–143) нг/мл, соответственно. У всех обследуемых лиц при анализе гормонального статуса отмечалась тенденция к повышению уровня инсулина (12,2 (6,9–31) мкЕд/мл). Оценка коэффициента НОМА-IR позволила установить, что у большинства пациентов с НАЖБП имеется инсулинорезистентность (медиана индекса 2,61 с размахом 1,79–8,16). Уровень лептина также был высоким у обследуемых лиц (22,98 (11,9–33,02) нг/мл) при низком уровне растворимых рецепторов к лептину (7,03 (4,49–10,16) нг/мл) и нормальном количестве адипонектина (4,93 (3,11–6,75) мг/мл). Данные изменения позволяют говорить о наличии гиперлептинемии

Таблица 6.

Результаты и сравнение данных лабораторных методов исследования в группах сравнения (1–2). Сравнение методом Mann-Whitney.

Примечание:

P50 – медиана, P25 – верхний квартиль, P75 – нижний квартиль, СОЭ – скорость оседания эритроцитов, АЛТ – аланинаминотрансфераза, АСТ – аспаратаминотрансфераза, АЛТ/АСТ – соотношение аланинаминотрансферазы к аспаратаминотрансферазе, ЩФ – щелочная фосфатаза, ГГТ – гамма-глутамилтранспептидаза, ЛПНП – липопротеиды низкой плотности, ЛПВП – липопротеиды высокой плотности, ПТИ – протромбиновый индекс, МНО – международное нормализованное отношение, >0,05 – различия статистически незначимы.

Table 6.

Results and comparison of laboratory methods studies in comparison groups (1–2). Comparison method Mann-Whitney.

Note:

P50-median, P25-upper quartile, P75-lower quartile, ESR – erythrocyte sedimentation rate – the rate erythrocyte sedimentation, ALT-alanine aminotransferase, AST – aspartate aminotransferase, ALT/AST – ratio alanine aminotransferases to aspartate aminotransferase, Alkaline phosphatase – alkaline phosphatase, GGT – gamma glutamyl- transpeptidase, LDL – low raft lipoproteins, HDL – lipoproteins high density, PTI – prothrombin index, The SET international normalized ratio, > 0.05-differences statistically insignificant.

Показатель	Группа 1			Группа 2			Z	p
	P50	P25	P75	P50	P25	P75		
Гемоглобин, г/л	149,00	139,00	156,00	149,00	134,00	158,00	0,000	1,00
Эритроциты, 109/л	4,82	4,34	5,28	4,88	4,71	5,16	-0,619	0,54
Лейкоциты, 109/л	6,05	4,50	6,40	6,90	5,05	8,05	-1,259	0,21
Тромбоциты, 109/л	274,00	247,50	289,50	235,00	214,00	270,00	1,331	0,18
СОЭ, мм/ч	5,50	3,00	11,00	7,00	5,00	15,00	-1,276	0,20
Глюкоза, ммоль/л	5,40	4,85	5,45	5,60	5,10	6,09	-1,334	0,18
АЛТ, Ед/л	42,50	25,00	74,00	34,26	20,10	50,45	0,738	0,46
АСТ, Ед/л	22,00	20,00	44,00	26,00	21,61	38,50	-0,264	0,79
АЛТ/АСТ	1,52	1,10	1,76	1,45	1,19	1,76	0,034	0,97
Общий белок, г/л	77,10	75,00	80,00	73,00	71,00	75,00	1,833	0,07
ЩФ, Ед/л	104,30	70,00	195,00	100,00	67,00	155,00	0,114	0,91
ГГТ, Ед/л	51,50	32,00	85,00	40,00	23,40	78,63	0,211	0,83
Холестерин, ммоль/л	5,10	4,60	5,80	5,45	4,70	6,40	-0,529	0,60
Триглицериды, ммоль/л	1,93	1,88	5,10	2,32	1,62	2,70	0,397	0,69
ЛПВП, ммоль/л	1,40	1,17	1,62	1,04	0,97	1,22	1,289	0,20
ЛПНП, ммоль/л	3,80	3,80	3,80	3,45	2,87	4,61	0,000	1,00
Обилирубин, мкмоль/л	12,35	11,20	14,70	13,15	9,35	20,50	-0,389	0,70
Пр.билирубин, мкмоль/л	4,40	2,80	4,60	4,00	1,40	11,26	0,114	0,91
ПТИ,%	96,00	91,00	107,00	95,00	93,00	99,00	0,149	0,88
МНО	1,03	0,98	1,09	1,06	1,02	1,08	-0,149	0,88

Таблица 7.

Гормональный статус и уровни неинвазивных биомаркеров фиброза печени в группах сравнения (1–2). Сравнение методом Mann-Whitney.

Примечание:

P50 – медиана, P25 – верхний квартиль, P75 – нижний квартиль, ММР 9 – матриксная металлопротеиназа 9, ТИМР 2 – тканевой ингибитор матриксных протеиназ 2, ТИМР 1 – тканевой ингибитор матриксных протеиназ 1, лептин/рецепторы – отношение уровня лептина в сыворотке крови к его растворимому рецептору, >0,05 – различия статистически незначимы.

Table 7.

Hormonal status and levels of non-invasive liver fibrosis biomarkers in comparison groups (1–2). Comparison by Mann-Whitney method.

Note:

P50-median, P25 - upper quartile, P75-lower quartile, ММР 9-matrix metalloproteinase 9, TIMP 2-tissue matrix proteinase inhibitor 2, TIMP- 1-tissue matrix proteinase inhibitor 1, and leptin/ receptor ratio in leptin levels in blood serum to its soluble receptor, >0,05– the difference statistically insignificant.

Показатель	Группа 1			Группа 2			Z	p
	P50	P25	P75	P50	P25	P75		
Инсулин, мМЕ/л	9,20	6,90	14,30	16,30	9,60	35,30	-1,187	0,24
Лептин, нг/мл	24,86	9,26	45,55	22,08	13,55	30,47	0,171	0,86
Адипонектин, мкг/мл	4,93	3,35	6,32	4,82	3,11	6,88	0,205	0,84
Рецепторы к лептину	7,26	5,64	10,16	7,03	4,49	9,67	0,597	0,55
Лептин/рецепторы	1,67	0,40	7,74	3,63	2,17	5,02	-0,239	0,81
ММР 9, нг/мл	768,00	669,00	865,00	304,00	220,00	391,00	1,964	0,05
ТИМР 2, нг/мл	110,50	84,00	232,00	113,00	83,00	143,00	0,218	0,83
ТИМР 1, нг/мл	1580,00	1395,00	1650,00	1430,00	1420,00	2585,00	-0,218	0,83

и лептинорезистентности у пациентов с НАЖБП. Нами также дополнительно была проведена оценка соотношения уровня лептина к его рецепторам, подъем которого выше 1, а именно 3,27 (1,24–5,46), подтверждает феномен лептинорезистентности у представленной когорты пациентов [24, 25].

Результаты исследования гормонального статуса, непрямых маркеров фиброза печени и их сравнение в группах в зависимости от наличия G аллеля представлены в *таблице 7*.

Уровень ММР-9 достоверно более низкий у пациентов с НАЖБП и генотипом C/G. G-аллель также имел значимую, сильную отрицательную корреляционную связь с указанным признаком (rs=(−0,878), p<0,02). Известно, что матриксные металлопротеазы (ММП) относят антифибротическим факторам, так как они участвуют в разрушении белков внутриклеточного матрикса (коллагеназы, желатиназы, стромолизины). Активность ММП подавляется тканевыми ингибиторами матриксных металлопротеаз (ТИМР). По соотношению фибротических и антифибротических факторов косвенно можно судить об активности фиброобразования в печени. Соответственно, по нашим данным, пациенты с НАЖБП и генотипом C/G подтверждены более агрессивному образованию фиброзной ткани (прогрессированию фиброза

печени) из-за недостатка антифибротических факторов, а именно ММР.

По данным ультразвукового абдоминального исследования у пациентов групп сравнения у всех определялись признаки, характерные для стеатоза печени (повышенная эхогенность печени, повышенная плотность). Различий по основным показателям ультразвукового исследования (размеры правой и левой доли печени, диаметр воротной вены, площадь селезенки, длина и ширина желчного пузыря, толщина стенки желчного пузыря, наличие конкрементов в желчном пузыре или билиарного сладжа, размеры поджелудочной железы, вирусного протока, наличие кальцинатов поджелудочной железы) в группах с генотипами C/C и C/G обнаружено не было.

Для оценки наличия фиброза печени и стадии его развития всем пациентам проводилась эластометрия. Количество лиц с отсутствием фиброза (0 стадия) и его наличием (1, 2, 3 стадии) в группах с различным генотипом было сравнимым. Однако обращает на себя внимание, что только носители G-аллеля имели высокую стадию фиброза 3, а среди пациентов со 2 стадией гетерозиготы встречались в 70%. При оценке различий нами было установлено, что носители G-аллеля имели достоверно более высокие стадии фиброза, особенно на ранней стадии заболевания ($X^2 = 4,156, p<0,05$).

Выводы

1. Имеются клинические признаки, позволяющие говорить о большей выраженности стеатоза печени у носителей G-аллеля гена PNPLA3 148M/I.
2. Для больных НАЖБП с генотипом C/G PNPLA3 148M/I характерно более агрессивное течение заболевания с формированием высоких прогрессирующих стадий фиброза.

Литература | References

1. Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis // World Gastroenterology Organisation Global Guidelines. June 2012. <http://www.worldgastroenterology.org/guidelines/global-guidelines/nafl-d-nash>
2. European Association for the Study of the Liver (EASL), European Association for the Study of Diabetes (EASD) and European Association for the Study of Obesity (EASO) Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology*. 2016;64(6):1388–1402. <http://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.11.004>
3. Sattar N., et al. Non-alcoholic fatty liver disease. *BMJ*. 2014;349: g4596. <https://doi.org/10.1136/bmj.g4596>
4. Jiantao Ma, Shih-Jen Hwang, Alison Pedley et al. Bi-directional analysis between fatty liver and cardiovascular disease risk factors. *Journal of Hepatology*. 2016;66(2):390–397. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2016.09.022>
5. Angulo P., Keach J. C., Batts K. P. et al. Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 1999;30:1356–1362. <http://doi.org/10.1002/hep.510300604>
6. Mary E. Rinella Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review *JAMA*. 2015;313(22):2263–2273. <http://doi.org/10.1001/jama.2015.5370>
7. Singh S, Allen AM, Wang Z, et al. Fibrosis progression in nonalcoholic fatty liver vs nonalcoholic steatohepatitis: a systematic review and meta-analysis of paired-biopsy studies. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2015;13(4):643–654. <http://doi.org/10.1016/j.cgh.2014.04.014>
8. Pais R, Charlotte F, Fedchuk L, et al. LIDO Study Group. A systematic review of follow-up biopsies reveals disease progression in patients with non-alcoholic fatty liver. *J Hepatol*. 2013;59(3):550–556. <http://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.04.027>
9. Драпкина О. М., Ивашкин В. Т. Эпидемиологические особенности неалкогольной жировой болезни печени в России (Результаты открытого многоцентрового проспективного исследования-наблюдения DIREG L 01903). *РЖГГК*. 2014;24(4):32–38.
Drapkina O. M., Ivashkin V. T. Epidemiologicheskie osobennosti nealkogol'noi zhirovoy bolezni pecheni v Rossii (Rezultaty otkrytogo mnogotsentrovogo prospektivnogo issledovaniya-nablyudeniya DIREG L 01903). *RZhGGK*. 2014;24(4):32–38.
10. Ивашкин В.Т., Драпкина О.М., Маев И.В. и др. Распространенность неалкогольной жировой болезни печени у пациентов амбулаторно-поликлинической практики в Российской Федерации: результаты исследования DIREG 2. *РЖГГК*. 2015;6:31–41.
Ivashkin V. T., Drapkina O. M., Maev I. V. i dr. Rasprostranennost' nealkogol'noi zhirovoy bolezni pecheni u patsientov ambulatorno-poliklinicheskoi praktiki v Rossiiskoi Federatsii: rezul'taty issledovaniya DIREG 2. *RZhGGK*. 2015;6:31–41.
11. Rohit Loomba, Nicholas Schork, Chi-Hua Chen, et al. Genetics of NAFLD in Twins Consortium Heritability of Hepatic Fibrosis and Steatosis Based on a Prospective Twin Study. *Gastroenterology*. 2015;149(7):1784–1793. <http://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.08.011>
12. Romeo S, Kozlitina J, Xing C et al. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet*. 2008;40:1461–1465. <http://doi.org/10.1038/ng.257>
13. Huang Y, He S, Li JZ et al. A feed-forward loop amplifies nutritional regulation of PNPLA3. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107(17):7892–7897. <http://doi.org/10.1073/pnas.1003585107>
14. He S, McPhaul C, Li JZ et al. A sequence variation (I148M) in PNPLA3 associated with nonalcoholic fatty liver disease disrupts triglyceride hydrolysis. *J Biol Chem*. 2010; 285(9): 6706–6715. <http://doi.org/10.1074/jbc.M109.064501>
15. Kumari M, Schoiswohl G, Chittraju C et al. Adiponutrin functions as a nutritionally regulated lysophosphatidic Acid acyltransferase. *Cell Metab*. 2012;15(5):691–702. <http://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.04.008>
16. Johansson L.E., Johansson L.M., Danielsson P., et al. Genetic variance in the adiponutrin gene family and childhood obesity. *PLoS One*. 2009;4:5327. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005327>
17. Li-Zhen Chen, Yong-Ning Xin, Ning Geng, et al. PNPLA3 I148M variant in nonalcoholic fatty liver disease: Demographic and ethnic characteristics and the role of the variant in nonalcoholic fatty liver fibrosis. *World J Gastroenterol*. 2015;21(3):794–802. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i3.794>
18. Sookoian S, Pirola CJ. Meta-analysis of the influence of I148M variant of patatin-like phospholipase domain containing 3 gene (PNPLA3) on the susceptibility and histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2011;53:1883–1894. <https://doi.org/10.1002/hep.24283>
19. Paola Dongiovanni, Benedetta Donati, Roberta Faresi I148M PNPLA3 variant and progressive liver disease. *World J Gastroenterol*. 2013;19(41): 6969–6978. <https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i41.6969>
20. Ивашкин В. Т., Драпкина О. М., Шульпекова Ю. О. Диагностика и лечение неалкогольной жировой болезни печени (методические рекомендации) М.: ООО «Издательский дом «М-Вести», 2009.
Ivashkin V. T., Drapkina O. M., Shul'pekova Yu. O. Diagnostika i lechenie nealkogol'noi zhirovoy bolezni pecheni (metodicheskie rekomendatsii) М.: ООО «Izdatel'skii dom «M-Vesti», 2009.
21. Portincasa P. From lipid secretion to cholesterol crystallization in bile. Relevance in cholesterol gallstone disease. *Ann. hepatol*. 2002;1(3):121–128. <https://doi.org/10.2174/1568008054064922>
22. Ливзан М.А., Лаптева И.В., Кролевец Т.С., Киселев И.Е. Особенности течения гастроэзофагеальной рефлюксной болезни, ассоциированной

- с ожирением и избыточной массой тела. *Терапевтический архив*. 2016;88(2):21–27.
- Livzan M. A., Lapteva I. V., Krolevets T. S., Kiselev I. E. Osobennosti techeniya gastroezofageal'noi reflyuksnoi bolezni, assotsiirovannoi s ozhireniem i izbytochnoi massoi tela. *Terapevticheskii arkhiv*. 2016;88(2):21–27. <https://doi.org/10.17116/terarkh201688221-27>
23. Michelino Di Rosa, Lucia Malaguarnera Genetic variants in candidate genes influencing NAFLD progression. *J Mol Med*. 2012;90:105–118. <https://doi.org/10.1007/s00109-011-0803-x>
24. Ливзан М. А., Лаптева И. В., Миллер Т. С. Роль лептина и лептинорезистентности в формировании неалкогольной жировой болезни печени у лиц с ожирением. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2014; 108(8):27–33.
- Livzan M. A., Lapteva I. V., Miller T. S. Rol' leptina i leptinorezistentnosti v formirovanii nealkogol'noi zhirovoi bolezni pecheni u lits s ozhireniem. *Ekspierimental'naya i klinicheskaya gastroenterologiya*. 2014; 108(8):27–33.
25. Ливзан М.А., Кролевец Т. С., Лаптева И. В., Черкащенко Н. А. Лептинорезистентность у лиц с неалкогольной жировой болезнью печени, ассоциированной с ожирением и избыточной массой тела. *Медицинский совет*. 2015; 13: 58–62.
- Livzan M. A., Krolevets T. S., Lapteva I. V., Cherkashchenko N. A. Leptinorezistentnost' u lits s nealkogol'noi zhirovoi boleznyu pecheni, assotsiirovannoi s ozhireniem i izbytochnoi massoi tela. *Meditinskii sovet*. 2015; 13: 58–62.