

## ГЕНЕТИКО-БИОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ ГАММА-ГЛУТАМИЛЦИКЛОТРАНСФЕРАЗЫ В ФОРМИРОВАНИИ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К САХАРНОМУ ДИАБЕТУ 2-го ТИПА

© Ю.Э. Азарова, Е.Ю. Клёсова, М.И. Чурилин, Т.А. Самгина, А.И. Конопля, А.В. Полоников

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования

«Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Курск

Для цитирования: Азарова Ю.Э., Клёсова Е.Ю., Чурилин М.И., и др. Генетико-биохимическое исследование роли гамма-глутамилциклотрансферазы в формировании предрасположенности к сахарному диабету 2-го типа // Экологическая генетика. – 2020. – Т. 18. – № 2. – С. 215–228. <https://doi.org/10.17816/ecogen16293>.

Поступила: 27.09.2019

Одобрена: 05.02.2020

Принята: 23.06.2020

✿ Дисбаланс в системе редокс-гомеостаза является важным звеном патогенеза сахарного диабета 2-го типа (СД2). Гамма-глутамилциклотрансфераза представляет собой фермент антиоксидантной защиты, непосредственно вовлеченный в метаболизм глутатиона, эндогенного антиоксиданта. Целью исследования стало изучение ассоциации однонуклеотидных замен (SNP) rs38420 (G > A), rs4270 (T > C), rs6462210 (C > T) и rs28679 (G > A) в гене *GGCT* с СД2. В исследование включено 1022 пациента с СД2 и 1064 условно здоровых добровольца. В результате нами впервые выявлена взаимосвязь SNP rs4270 гена *GGCT* с СД2 в русской популяции. Нами также установлены генно-средовые взаимодействия, ассоциированные с предрасположенностью к заболеванию: протективный эффект гена гамма-глутамилциклотрансферазы проявлялся только у некурящих лиц при условии ежедневного употребления ими свежих овощей и фруктов, тогда как у лиц с недостаточным потреблением растительной пищи, а также у всех курящих больных защитный эффект *GGCT* не наблюдался. У пациентов с СД2 содержание перекиси водорода и мономера глутатиона резко повышено по сравнению с контролем. Также было установлено, что SNP rs4270 связан с повышенным содержанием восстановленного глутатиона в плазме крови больных СД2. Таким образом, впервые установлено, что полиморфный локус rs4270 в гене *GGCT* ассоциирован с предрасположенностью к СД2, но его связь с заболеванием модулируется курением и употреблением свежей растительной пищи.

✿ **Ключевые слова:** сахарный диабет 2-го типа; гамма-глутамилциклотрансфераза; однонуклеотидный полиморфизм; курение.

## GENETIC AND BIOCHEMICAL INVESTIGATION OF THE GAMMA-GLUTAMYL CYCLOTRANSFERASE ROLE IN PREDISPOSITION TO TYPE 2 DIABETES MELLITUS

© Iu.E. Azarova, E.Yu. Klyosova, M.I. Churilin, T.A. Samgina, A.I. Konoplya, A.V. Polonikov

Kursk State Medical University, Kursk, Russia

Cite this article as: Azarova IuE, Klyosova EYu, Churilin MI, et al. Genetic and biochemical investigation of the gamma-glutamylcyclotransferase role in predisposition to type 2 diabetes mellitus. *Ecological genetics*. 2020;18(2):215-228. <https://doi.org/10.17816/ecogen16293>.

Received: 27.09.2019

Revised: 05.02.2020

Accepted: 23.06.2020

✿ **Background.** Imbalance in the system of redox homeostasis is an important link in the pathogenesis of type 2 diabetes (T2D). Gamma-glutamyl cyclotransferase is an antioxidant defense enzyme directly involved in the metabolism of glutathione, an endogenous antioxidant. **The aim** of the study was to examine the association of single nucleotide polymorphisms (SNP) rs38420 (G > A), rs4270 (T > C), rs6462210 (C > T) and rs28679 (G > A) in *GGCT* gene with the risk of developing T2D. **Materials and Methods.** The study included 1022 T2D patients and 1064 healthy volunteers. Genotyping of *GGCT* gene loci was performed using iPLEX technology on a MassARRAY Analyzer 4 genome time-of-flight mass spectrometer (Agena Bioscience). **Results.** As a result, we identified for the first time the association of SNP rs4270 in the *GGCT* gene with the risk of T2D in the Russian population. We have also established genetic and environmental interactions associated with predisposition to the disease: protective effect of gamma-glutamyl cyclotransferase gene was observed only in non-smokers under condition of daily consumption of fresh vegetables and fruits, whereas in persons with insufficient consumption of plant foods, as well as in all smoking patients protective effect of *GGCT* was not observed. In patients with T2D, the level of hydrogen peroxide and glutathione monomer was sharply increased compared to the controls. SNP rs4270 was also found to be associated with elevated levels of reduced glutathione in the plasma of type 2 diabetics.

**Conclusion.** Thus, for the first time it was established that polymorphic locus rs4270 in the *GGCT* gene is associated with a predisposition to T2D, but its relationship with the disease is modulated by smoking and fresh plant foods consumption.

✿ **Keywords:** diabetes mellitus, type 2; gamma-glutamylcyclotransferase; polymorphism, single nucleotide; smoking.

## ВВЕДЕНИЕ

По данным Международной диабетической федерации, в мире сахарным диабетом страдают 425 млн человек [1]. На конец 2018 г. в России насчитывалось 4,58 млн больных диабетом, более 90 % которых страдают сахарным диабетом 2-го типа (СД2) [2]. Заболевание представляет собой постоянно прогрессирующую хроническую патологию, в развитии которого принимают участие генетические и средовые факторы. Полногеномные ассоциативные исследования, проведенные с 2007 г. и включавшие более 1 млн больных и 3 млн здоровых лиц, выявили сотни однонуклеотидных вариантов (SNPs), связанных с риском развития СД2 [3]. Локусы, биологическую роль которых удалось установить, в большей степени влияют на бета-клетки поджелудочной железы, определяя их количество, массу, функциональную активность, чувствительность к уровню глюкозы в крови, а также выживаемость в условиях глюкозо- и липотоксичности. Гораздо меньшее количество вариантов ассоциировано с изменениями в сигнализации инсулина в периферических тканях, приводящих к инсулинорезистентности [4]. Помимо снижения чувствительности периферических тканей к инсулину и нарушения его продукции поджелудочной железой, существующая сегодня концепция патогенеза СД2 включает увеличение продукции глюкозы печенью, усиление секреции глюкагона островками Лангерганса, уменьшение синтеза гормонов желудочно-кишечного тракта инкретинов, повышение реабсорбции глюкозы почками, усиление всасывания глюкозы в кишечнике, а также повышение активности центров аппетита в гипоталамусе. Перечисленные восемь звеньев составляют так называемый «угрожающий октет» DeFronzo [5], любой компонент которого может способствовать развитию хронической гипергликемии и нарушению практически всех видов обмена.

Важным звеном в цепи событий, приводящих к развитию СД2, является нарушение редокс-го-

меостаза, которое характеризуется избыточной продукцией активных форм кислорода и азота, дефицитом антиоксидантов и рассматривается в качестве основного механизма повреждения внутриклеточных сигнальных молекул, результатом чего являются дисфункция островкового аппарата поджелудочной железы и прогрессирующая инсулинорезистентность [6]. В исследованиях последних лет убедительно показано, что курение, неправильное питание, в первую очередь, недостаток свежих овощей и фруктов, избыточная масса тела и ожирение снижают чувствительность клеток к инсулину и провоцируют манифестацию СД2 [7, 8]. Баланс в про- и антиоксидантной системе в значительной степени детерминирован способностью клеток синтезировать универсальный антиоксидант глутатион в ходе так называемого гамма-глутамильного цикла. Разрушаясь, глутатион превращается в цистеинилглицин и гамма-глутамиламинокислоту. Последний фрагмент транспортируется внутрь клетки с помощью специального мембранного переносчика. Гамма-глутамилциклотрансфераза (*GGCT*) является ключевым ферментом цикла и катализирует превращение гамма-глутамилсодержащего дипептида в аминокислоту и 5-оксопролин, используемый для регенерации глутаминовой кислоты к началу следующего витка синтеза глутатиона (*GSH*) [9]. Таким образом, *GGCT* играет значимую роль в поддержании внутри- и внеклеточного гомеостаза глутатиона. Тем не менее исследований, оценивающих вклад генетических вариантов *GGCT* в патогенез СД2, на сегодняшний день не проводилось. Вопросы взаимосвязи между потреблением овощей и фруктов, курением и полиморфными вариантами генов антиоксидантной системы, в частности гена гамма-глутамилциклотрансферазы, остаются нераскрытыми на сегодняшний день и требуют изучения для расшифровки фундаментальных основ болезни.

*Цель исследования* — изучить ассоциации однонуклеотидных замен rs38420, rs4270, rs6462210, rs28679 в гене *GGCT* с СД2 у больных и здоровых

лиц, а также оценить триггерную роль курения, потребления свежих овощей и фруктов в реализации наследственной предрасположенности к СД2 у носителей различных генотипов *GGCT*.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Протокол исследования одобрен Региональным этическим комитетом при Курском государственном медицинском университете (выписка из протокола № 10 от 12.12.2016). В исследование приглашали больных СД2, получавших стационарное лечение на базе эндокринологического отделения Курской городской клинической больницы скорой медицинской помощи. В группу здоровых индивидов вошли доноры областной станции переливания крови, а также материал наших предыдущих исследований [10, 11]. Всего за три года (2016–2018) в исследование включено 2086 неродственных индивидов славянского происхождения, в том числе 1022 пациента с подтвержденным диагнозом СД2 (358 мужчин и 664 женщины, средний возраст  $61,57 \pm 10,44$  года) и 1064 условно здоровых добровольца (392 мужчины и 672 женщины, средний возраст  $61,00 \pm 7,82$  года). Группы больных СД2 и контроля были сопоставимы по полу ( $p = 0,41$ ) и возрасту ( $p = 0,16$ ). Критериями включения в группу больных служили: наличие верифицированного врачом диагноза болезни, подтвержденного клинически и лабораторно-инструментально, возраст старше 35 лет, наличие письменного информированного согласия на участие в исследовании. Критериями включения лиц в группу контроля служили: возраст старше 35 лет, нормальный уровень гликемии согласно критериям Всемирной организации здравоохранения [12], отсутствие тяжелых хронических заболеваний, наличие письменного информированного согласия.

Участники исследования вошли в две основных группы: группу больных СД2 и группу здоровых. Пациенты с СД2 и контроль были стратифицированы по потреблению свежих овощей и фруктов и статусу курения на 4 подгруппы: в первую вошли некурящие больные СД2 и здоровые лица, ежедневно потребляющие свежие овощи и фрукты; во вторую — курящие больные СД2 и здоровые лица, ежедневно потребляющие растительную пищу; в третью — некурящие больные СД2 и здоровые лица, не потребляющие свежие овощи

и фрукты каждый день; в четвертую — курящие больные СД2 и здоровые лица, не потребляющие фрукты и овощи каждый день.

Как у больных, так и у здоровых лиц проводилось анкетирование по основным факторам риска. Индекс массы тела (ИМТ), статус курения, наследственной отягощенности по СД2, 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 было оценено как недостаточное, в соответствии с критериями Всемирной организации здравоохранения [12]. О наличии нарушений углеводного обмена судили по результатам тестов уровня гликированного гемоглобина, концентрации глюкозы натощак и через 2 ч после нагрузки 75 г глюкозы. Концентрации глюкозы, гликированного гемоглобина, общего холестерина, липопротеинов низкой плотности (ЛНП), липопротеинов высокой плотности (ЛВП), триацилглицеролов (ТАГ) определяли на полуавтоматическом биохимическом анализаторе Clima MC-15 (RAL, Испания) стандартными наборами реагентов фирмы «Диакон-ДС» (Россия).

Для проведения генетических исследований у всех больных и здоровых пациентов проводили забор 5 мл венозной крови натощак в вакуумные пробирки Vacuette с EDTA. Геномную ДНК выделяли стандартным методом фенольно-хлороформной экстракции. Качество выделенной ДНК оценивали по степени чистоты и концентрации раствора на спектрофотометре NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, США). Для молекулярно-генетического анализа с помощью интернет-ресурса SNPinfo Web Server [13] было отобрано 4 однонуклеотидных полиморфизма гена *GGCT*, а именно: rs38420 (G > A), rs4270 (T > C), rs6462210 (C > T) и rs28679 (G > A). Выбор SNPs в гене *GGCT* основывался на оценке гаплотипической структуры гена (отбор tagSNPs,  $r^2 \geq 0,8$ ), частоты минорного аллеля (MAF > 5 %), а также регуляторного потенциала SNPs (способности полиморфного сайта влиять на трехмерную структуру хроматина,

связывание транскрипционных факторов и микроРНК, сплайсинг и активность белкового продукта гена [13, 14]. Генотипирование полиморфизмов гена *GGCT* проводили с использованием технологии iPLEX на геномном времяпролетном масс-спектрометре MassARRAY Analyzer 4 (Agena Bioscience, США). Праймеры синтезированы фирмой «Евроген» (Москва).

Для измерения содержания перекиси водорода и глутатиона, проводили забор 5 мл венозной крови в вакуумные пробирки с гепарином лития, центрифугировали их 15 мин при 3500 об./мин, для детекции  $H_2O_2$  плазму аликвотировали и замораживали при  $-80^\circ C$ . Образцы, предназначенные для измерения уровня глутатиона, предварительно подвергали депротенинизации 5%-раствором метафосфорной кислоты, центрифугировали 10 мин при 12000 об./мин, надосадочную жидкость аликвотировали и замораживали при  $-80^\circ C$ . Концентрации перекиси водорода и глутатиона определяли с помощью наборов OxiSelect ROS/RNS Assay Kit и GSH/GSSG Assay Kit (Cell Biolabs, США) флуориметрическим и колориметрическим методом соответственно на микропланшетном ридере Varioscan Flash (Thermo Fisher Scientific, США).

Размер выборки рассчитывали с помощью онлайн калькулятора Genetic Association Study Power Calculator [15] с учетом частоты минорных аллелей полиморфных локусов rs38420, rs4270, rs6462210, rs28679 в гене *GGCT* и заболеваемости СД2 в Курской области. Для достижения статистической мощности исследования 85 % при пороговом уровне значимости ассоциаций  $p = 0,05$ , минимальный размер выборки больных и здоровых должен составлять не менее 1000 человек.

Ассоциации генотипов с риском СД2 изучали методом логистической регрессии с поправкой на пол, возраст и ИМТ с помощью программы SNPStats [16]. Тестировалось пять генетических моделей: кодоминантная, доминантная, рецессивная, сверхдоминантная и log-аддитивная. В качестве лучшей выбирали модель с наименьшим численным значением критерия Акаике (AIC, Akaike information).

Количественные биохимические показатели проверяли на нормальность распределения по критерию Колмогорова – Смирнова. Показатели с нормальным распределением были описаны в формате: среднее значение  $\pm$  стандартное откло-

нение, в качестве теста для оценки статистической значимости различий между группами использовали тест Стьюдента. Показатели с ненормальным распределением описывали с использованием медианы, первого и третьего квартилей в формате  $Me [Q_1; Q_3]$ , в качестве теста для оценки статистической значимости различий между группами использовали критерий Манна – Уитни. Выявленные межгрупповые отличия считались значимыми при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Клинико-лабораторные характеристики участников исследования представлены в табл. 1. Стаж диабета у больных составил 10 лет. У 34,7 % пациентов имела место отягощенная наследственность по СД2. Доля курящих в группе контроля (28,9 %) превышала таковую в группе больных (22,5 %). Кроме того, пациенты с СД2 и здоровые отличались по своему отношению к растительной пище: только 48,9 % больных 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 83,4 %. Показатели углеводного и липидного обмена были проанализированы у всех участников проекта, при этом концентрации глюкозы натощак, гликированного гемоглобина, общего холестерина, ЛНП и ТАГ были выше у больных СД2, концентрация ЛВП была выше в группе контроля ( $p < 0,0001$ ).

Частоты аллелей и генотипов полиморфных локусов *GGCT* представлены в табл. 2. Все исследованные SNPs находились в соответствии с равновесием Харди – Вайнберга ( $p > 0,05$ ). Частоты аллелей однонуклеотидных замен в гене *GGCT* были сопоставимы с европейскими популяциями, согласно данным проекта «1000 Genomes», депонированных в Ensembl [17]. Частота минорного аллеля С rs4270 была ниже в группе пациентов с СД2 по сравнению с группой контроля ( $p = 0,009$ ). Статистически значимых различий в частоте аллелей SNPs rs38420, rs6462210 и rs28679 установлено не было ( $p > 0,05$ ). Генотипы Т/С–С/С варианта rs4270 были значимо ассоциированы с пониженным риском развития СД2 (отношение шансов (odds ratio) OR 0,80; 95 % CI 0,67–0,96;  $p = 0,014$ , доминантная модель).

Таблица 1

Клинико-лабораторные характеристики участников исследования,  $Me [Q_1; Q_3]$ 

Параметры сравнения	Группа контроля ( $n = 1064$ )	Группа пациентов с СД2 ( $n = 1022$ )	$p$
Возраст, лет (ср. $\pm$ ст. откл.)	61,00 $\pm$ 7,82	61,57 $\pm$ 10,44	0,16
Мужчины, $n$ (%)	392 (36,8)	358 (35,0)	0,41
Женщины, $n$ (%)	672 (63,2)	664 (65,0)	
Индекс массы тела, кг/м <sup>2</sup> (ср. $\pm$ ст. откл.)	27,04 $\pm$ 3,55	32,13 $\pm$ 6,60	0,001
Ежедневно потребляющие овощи и фрукты, $n$ (%)	887 (83,4)	500 (48,9)	<0,0001
Курящие, $n$ (%)	308 (28,9)	230 (22,5)	0,0009
Стаж диабета, лет	–	10,01 [4; 14]	–
Наследственная отягощенность, $n$ (%)	–	355 (34,7)	–
HbA <sub>1c</sub> , %	4,58 [4,11; 4,87]	9,10 [7,90; 11,00]	<0,0001
Глюкоза крови натощак, ммоль/л	4,71 [4,39; 4,84]	12,00 [9,49; 14,90]	<0,0001
Общий холестерин, ммоль/л	3,06 [2,86; 3,12]	4,93 [4,14; 5,90]	<0,0001
ЛПН, ммоль/л	1,74 [1,60; 1,79]	3,10 [2,50; 4,05]	<0,0001
ЛВП, ммоль/л	1,47 [1,36; 1,62]	0,84 [0,73; 1,00]	<0,0001
ТАГ, ммоль/л	1,15 [0,98; 1,23]	2,17 [1,55; 2,93]	<0,0001

Примечание. ЛНП — липопротеины низкой плотности; ЛВП — липопротеины высокой плотности; ТАГ — триацилглицеролы.

Таблица 2

Частоты аллелей и генотипов *GGCT* у больных СД2 и здоровых лиц

SNP	Аллель/ генотип	Группа контроля, $n$ (%)	Группа больных СД2, $n$ (%)	OR (95 % CI)	$p$	OR (95 % CI)*	$p^*$
rs38420	G/G	671 (63,5)	657 (64,3)	1,00	0,41 <sup>R</sup>	1,00	0,31 <sup>R</sup>
	G/A	337 (31,9)	325 (31,8)				
	A/A	48 (4,5)	39 (3,8)	0,83 (0,54–1,28)	0,538	0,78 (0,48–1,27)	–
	A	20,5	19,7	0,95 (0,82–1,11)			
rs4270	T/T	604 (57,5)	639 (62,8)	1,00	0,014 <sup>D</sup>	1,00	0,013 <sup>D</sup>
	T/C	381 (36,2)	330 (32,4)				
	C/C	66 (6,3)	49 (4,8)	0,82 (0,71–0,95)	0,009	–	–
	C	24,4	21,0				
rs6462210	C/C	782 (74,3)	755 (73,9)	1,00	0,39 <sup>R</sup>	1,00	0,29 <sup>R</sup>
	C/T	250 (23,8)	242 (23,7)				
	T/T	20 (1,9)	25 (2,5)	1,29 (0,71–2,34)	0,641	1,41 (0,74–2,70)	–
	T	13,8	14,3	1,04 (0,87–1,24)			
rs28679	G/G	533 (51)	531 (52,2)	1,00	0,12 <sup>R</sup>	1,00 R	0,053 <sup>R</sup>
	G/A	414 (39,6)	410 (40,3)				
	A/A	98 (9,4)	76 (7,5)	0,78 (0,57–1,07)	0,268	0,71 (0,49–1,01)	–
	A	29,2	27,6	0,93 (0,81–1,06)			

Примечание. \* Расчеты выполнены с поправкой на пол, возраст и индекс массы тела, R — рецессивная модель, D — log-аддитивная модель, OR — отношение шансов,  $p$  — уровень значимости ассоциаций.

Ассоциация оставалась значимой и после введения поправок на пол, возраст и ИМТ (OR 0,80; 95 % CI 0,67–0,95;  $p = 0,013$ ). Статистически значимых различий по частотам генотипов локусов rs38420, rs6462210, rs28679 между группами больных СД2 и здоровых лиц не выявлено ( $p > 0,05$ ).

Анализ гаметического неравновесия по сцеплению показал, что rs38420 сцеплен с rs6462210 ( $D' = 0,960$ ,  $p < 0,0001$ ) и rs28679 ( $D' = 0,961$ ,  $p < 0,0001$ ), и последние 2 SNPs сцеплены между собой ( $D' = 0,951$ ,  $p < 0,0001$ ). При анализе частот гаплотипов у больных и здоровых лиц (табл. 3) обнаружено, что гаплотип G–C–C–G, включающий минорные аллели rs38420–rs4270–rs6462210–rs28679, ассоциирован с пониженным риском заболевания (OR 0,72; 95 % CI 0,58–0,90;  $p = 0,0032$ ).

Принимая во внимание тот факт, что растительная пища служит источником экзогенных антиоксидантов, а изучаемый ген *GGCT* непосредственно вовлечен в метаболизм антиоксиданта глутатиона, нам представлялось важным провести оценку влияния потребления свежих овощей и фруктов на ассоциации полиморфных локусов *GGCT* с риском развития СД2. Поскольку курение является мощным фактором риска СД2 [12], анализ в подгруппах участников исследования с различным отношением к овощам и фруктам проводили с учетом статуса курения. Подгруппы некурящих и курящих больных СД2 с достаточным потреблением овощей и фруктов отличались по возрасту, соотношению мужчин и женщин, ИМТ и длительности заболе-

вания, с преобладанием более молодых мужчин с меньшим стажем заболевания и более низким значением ИМТ среди курящих пациентов; подгруппы пациентов с недостаточным потреблением свежих овощей и фруктов отличались по тем же параметрам, с преобладанием более пожилых женщин с большим стажем заболевания и более высоким ИМТ среди некурящих больных с СД2 (данные не представлены). Генотипы T/C–C/C rs4270 ассоциировались с пониженным риском развития СД2 только в подгруппе некурящих пациентов, ежедневно потребляющих достаточное количество овощей и фруктов (OR 0,71; 95 % CI 0,54–0,93;  $p = 0,011$ ; табл. 4). Примечательно, что у некурящих больных, не потребляющих ежедневно достаточно овощей и фруктов, ассоциация полиморфных локусов гена *GGCT* с риском СД2 отсутствовала. Ассоциация полиморфизма *GGCT* с СД2 также отсутствовала у всех курящих пациентов, независимо от их отношения к свежим овощам и фруктам ( $p > 0,05$ ). Анализ частот гаплотипов в тех же четырех подгруппах (табл. 5) показал тот же тренд: ассоциация гаплотипа G–C–C–G, состоящего из альтернативных аллелей rs38420–rs4270–rs6462210–rs28679, была отмечена только в подгруппе некурящих и ежедневно потребляющих достаточное количество свежей растительной пищи (OR 0,62; 95 % CI 0,45–0,86;  $p = 0,0039$ ).

Оценка редокс-статуса 588 участников исследования показала, что уровень перекиси водорода  $H_2O_2$  в плазме 419 больных (3,82 [2,95; 4,94] мкмоль/л) был значительно выше такового в плазме

Таблица 3

Частоты гаплотипов *GGCT* у больных СД2 и здоровых лиц

rs38420	rs4270	rs6462210	rs28679	Частота гаплотипов		OR (95 % CI)*	$p^*$
				группа контроля	группа больных СД2		
G	T	C	G	0,4114	0,4553	1,00	—
A	T	C	A	0,1824	0,1803	0,89 (0,75–1,07)	0,21
G	C	C	G	0,1556	0,1233	0,72 (0,58–0,90)	0,0032
G	T	T	G	0,0751	0,0824	0,99 (0,76–1,28)	0,94
G	T	C	A	0,0785	0,0699	0,80 (0,61–1,04)	0,098
G	C	T	G	0,0583	0,0592	0,92 (0,68–1,24)	0,57
A	C	C	A	0,0151	0,0131	0,80 (0,38–1,66)	0,54
G	C	C	A	0,0125	0,0127	0,91 (0,43–1,92)	0,81

Примечания. \* Расчеты выполнены с поправкой на пол, возраст и индекс массы тела, OR — отношение шансов.

Таблица 4

Частоты генотипов GGCT у больных СД2 и здоровых лиц, стратифицированных по потреблению овощей и фруктов и курению

SNP гена GGCT	Генотип	Некурящие				Курящие			
		контроль	больные СД2	OR (95 % CI)*	<i>p</i> *	контроль	больные СД2	OR (95 % CI)*	<i>p</i> *
Потребляющие достаточно овощей и фруктов									
rs38420	G/G	384 (63,6 %)	252 (64 %)	1,00	0,25 <sup>R</sup>	180 (65,2 %)	71 (67 %)	1,00	0,31 <sup>R</sup>
	G/A	191 (31,6 %)	128 (32,5 %)			84 (30,4 %)	32 (30,2 %)		
	A/A	29 (4,8 %)	14 (3,5 %)			12 (4,3 %)	3 (2,8 %)		
rs4270	T/T	342 (56,6 %)	256 (65,1 %)	1,00	0,011 <sup>D</sup>	164 (60,7 %)	74 (69,8 %)	1,00	0,25 <sup>D</sup>
	T/C	216 (35,8 %)	119 (30,3 %)	0,71 (0,54–0,93)		95 (35,2 %)	30 (28,3 %)	0,72 (0,41–1,27)	
	C/C	46 (7,6 %)	18 (4,6 %)			11 (4,1 %)	2 (1,9 %)		
rs6462210	C/C	442 (73,5 %)	296 (75,1 %)	1,00	0,16 <sup>R</sup>	207 (75,3 %)	83 (78,3 %)	1,00	0,17 <sup>R</sup>
	C/T	150 (25 %)	87 (22,1 %)			61 (22,2 %)	22 (20,8 %)		
	T/T	9 (1,5 %)	11 (2,8 %)			7 (2,5 %)	1 (0,9 %)		
rs28679	G/G	306 (51,3 %)	202 (51,4 %)	1,00	0,054 <sup>R</sup>	140 (51,5 %)	48 (47,1 %)	1,00	0,27 <sup>R</sup>
	G/A	230 (38,5 %)	161 (41 %)			109 (40,1 %)	46 (45,1 %)		
	A/A	61 (10,2 %)	30 (7,6 %)			23 (8,5 %)	8 (7,8 %)		
Потребляющие недостаточно овощей и фруктов									
rs38420	G/G	89 (61,4 %)	259 (65,2 %)	1,00	0,96 <sup>R</sup>	18 (58,1 %)	75 (60,5 %)	1,00	0,73 <sup>R</sup>
	G/A	51 (35,2 %)	124 (31,2 %)			11 (35,5 %)	41 (33,1 %)		
	A/A	5 (3,5 %)	14 (3,5 %)			2 (6,5 %)	8 (6,5 %)		
rs4270	T/T	74 (50,7 %)	234 (59,2 %)	1,00	0,30 <sup>D</sup>	24 (77,4 %)	75 (60,5 %)	1,00	0,13 <sup>D</sup>
	T/C	63 (43,1 %)	139 (35,2 %)	0,80(0,53–1,21)		7 (22,6 %)	42 (33,9 %)	2,06 (0,78–5,39)	
	C/C	9 (6,2 %)	22 (5,6 %)			0	7 (5,7 %)		
rs6462210	C/C	109 (74,7 %)	281 (70,6 %)	1,00	0,40 <sup>D</sup>	24 (80 %)	95 (76,6 %)	1,00	0,79 <sup>D</sup>
	C/T	33 (22,6 %)	108 (27,1 %)	1,22 (0,77–1,93)		6 (20 %)	25 (20,2 %)	1,15 (0,41–3,22)	
	T/T	4 (2,7 %)	9 (2,3 %)			0	4 (3,2 %)		
rs28679	G/G	72 (49,3 %)	223 (56 %)	1,00	0,91 <sup>R</sup>	15 (50 %)	58 (46,8 %)	1,00	0,63 <sup>R</sup>
	G/A	64 (43,8 %)	148 (37,2 %)			11 (36,7 %)	55 (44,4 %)		
	A/A	10 (6,8 %)	27 (6,8 %)			4 (13,3 %)	11 (8,9 %)		

Примечания. \* Расчеты выполнены с поправкой на пол, возраст и индекс массы тела. D — доминантная модель, R — рецессивная модель, AD — log-аддитивная модель. Полу жирным выделены значимые OR и *p*. OR — отношение шансов, *p* — уровень значимости ассоциаций.

163 здоровых (3,05 [2,49; 3,64] мкмоль/л,  $p < 0,0001$ ). Содержание восстановленного GSH было также выше в группе пациентов с СД2 (0,79 [0,48; 1,05] мкмоль/л) по сравнению с контролем (0,37 [0,31; 0,50] мкмоль/л,  $p < 0,0001$ ). При анализе взаимосвязей между генотипами *GGCT* и биохимическими показателями редокс-статуса больных СД2 было обнаружено, что генотипы T/C—C/C rs4270 ассоциированы с повышением уровня GSH в плазме на 0,18 мкмоль/л (95 % CI 0,04–0,32,  $p = 0,016$ ), тогда как гаплотип G—C—C—G, состоящий из минорных аллелей rs38420—rs4270—rs6462210—rs28679, повышает уровень восстановленного глутатиона на 0,17 мкмоль/л (95 % CI 0,02–0,34,  $p = 0,03$ ).

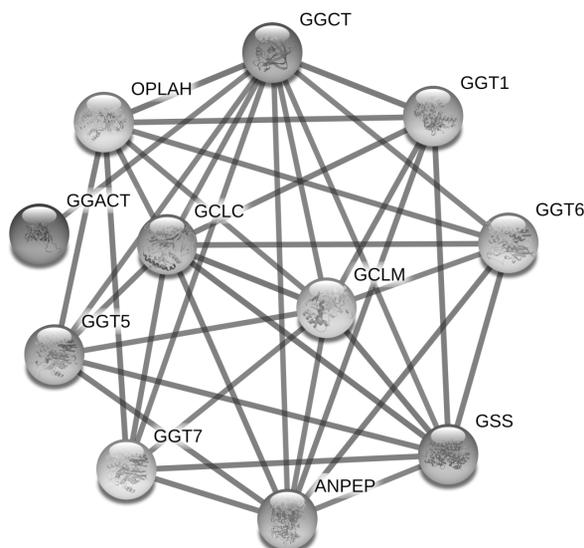
## ОБСУЖДЕНИЕ

В рамках настоящего исследования впервые выявлена ассоциация полиморфного локуса rs4270 гена *GGCT* с пониженным риском развития СД2 в русской популяции. Нами также установлены генно-средовые взаимодействия, ассоциированные с предрасположенностью к заболеванию: протективный эффект гена гамма-глутамилциклотрансферазы проявлялся только у некурящих лиц при условии ежедневного употребления ими свежих овощей и фруктов, тогда как у лиц с недостаточным потреблением растительной пищи, а также у всех курящих больных защитный эффект *GGCT* не наблюдался. У больных СД2 содержание перекиси водорода и мономера глутатиона резко повышено по сравнению с контролем. Также было установлено, что SNP rs4270 связан с повышением содержания восстановленного глутатиона в плазме крови больных СД2.

Гамма-глутамилциклотрансфераза (*GGCT*, 188 аминокислот, 21 кДа) — это регуляторный фермент антиоксидантной системы, главная функция которого заключается в поддержании внутриклеточного гомеостаза GSH, антиоксиданта, нейтрализующего все виды перекисных соединений и свободнорадикальных частиц. Фермент входит в гамма-глутамильный цикл, начинающийся с синтеза GSH из глутамата, цистеина и глицина под действием глутаматцистеинлигазы (*GCL*) и глутатионсинтетазы (*GSS*) с затратой двух молекул аденозинтрифосфата. Глутатион далее может быть экспортирован из клетки с помощью специально-

го трансмембранного переносчика. Внеклеточные гамма-глутамилтрансфераза (*GGT*) и дипептидаза (*DP*) разрушают GSH до аминокислот цистеина, глицина и гамма-глутамил содержащего дипептида, транспортируемых внутрь клетки. *GGCT* катализирует превращение гамма-глутамиламинокислоты в соответствующую аминокислоту и 5-оксопролин. Последний претерпевает гидролиз под действием оксопролиназы (*OPLAH*) с затратой одной молекулы аденозинтрифосфата и превращается в глутамат, вступающий вместе с цистеином и глицином в следующий виток синтеза GSH [18]. Дополнительное значение *GGCT* еще заключается в том, что этот фермент может осуществлять регуляцию *de novo* синтеза глутатиона благодаря своей активности в отношении гамма-глутамилцистеина, являющегося также субстратом *GSS*. Аффинность *GSS* к  $\gamma$ -глутамилцистеину выше таковой *GGCT*, и в нормальных условиях образуемый *GCL* продукт направляется на синтез GSH, однако при избытке глутамата и цистеина  $\gamma$ -Glu-Cys превращается в цистеин и 5-оксопролин под действием *GGCT*. Наконец, в условиях недостатка цистеина, *GCL* может катализировать конденсацию глутамата с отличной от цистеина аминокислотой, образуя гамма-глутамиламинокислоту, — потенциальный субстрат *GGCT*, превращаемый в аминокислоту и 5-оксопролин [19]. Функции *GGCT* не ограничены участием в реутилизации фрагментов GSH. Y. Ohno et al. [20] показали, что фермент также участвует в регуляции клеточного цикла, старения и необходим для пролиферации и дифференцировки клеток.

Анализ взаимодействий *GGCT* с другими генами на уровне белковых продуктов, выполненный с помощью инструмента STRING [21], показал, что *GGCT* образует сеть из 10 белков (см. рисунок). Анализ обогащения терминами генных онтологий Gene Ontology [22] обнаружил, что 8 ферментов: 5-оксопролиназа (*OPLAH*), каталитическая субъединица глутаматцистеинлигазы (*GCLC*), модифицирующая субъединица глутаматцистеинлигазы (*GCLM*), глутатионсинтетазы (*GSS*), гамма-глутамилтрансфераза 1 (*GGT1*), гамма-глутамилтрансфераза 5 (*GGT5*), гамма-глутамилтрансфераза 6 (*GGT6*), гамма-глутамилтрансфераза 7 (*GGT7*), совместно с *GGCT*, ответственны за биосинтез глутатиона (уровень значимости этой ассоциации с учетом поправки на множественное тестирование



Сеть белков, образуемая гамма-глутамилциклотрансферазой. GGCT — гамма-глутамилциклотрансфераза; OPLAH — 5-оксипролиназа; GGACT — гамма-глутамиламинциклотрансфераза; GCLC — глутаматцистеинлигаза, каталитическая субъединица; GCLM — глутаматцистеинлигаза, модифицирующая субъединица; GSS — глутатионсинтаза; ANPEP — аминопептидаза N; GGT1 — гамма-глутамилтрансфераза 1; GGT5 — гамма-глутамилтрансфераза 5; GGT6 — гамма-глутамилтрансфераза 6; GGT7 — гамма-глутамилтрансфераза 7

(false discovery rate),  $FDR = 1,47 \cdot 10^{-23}$ , тогда как GCLC, GCLM и GGCT участвуют в апоптотических изменениях митохондрий ( $FDR = 4,67 \cdot 10^{-5}$ ).

Выполненное нами исследование в русской популяции выявило ассоциацию однонуклеотидной замены rs4270 (T > C) в 3'-нетранслируемой области гена *GGCT* с пониженным риском развития СД2, тем самым впервые демонстрируя потенциальную вовлеченность гена гамма-глутамилциклотрансферазы в патогенез этой болезни. В литературе есть единичные исследования, посвященные изучению роли *GGCT* в развитии опухолей различной локализации [23–26]. Данные о связи *GGCT* и СД2 отсутствуют. Проведенный нами биоинформатический анализ установил, что минорные аллели всех изучаемых SNPs (rs38420 (G > A), rs4270 (T > C), rs6462210 (C > T) и rs28679 (G > A)) связаны с увеличением экспрессии гена *GGCT* в поджелудочной железе, нервной системе мышечной и висцеральной жировой ткани [27]. Согласно экспериментальным данным по оценке эффектов однонуклеотидных вариантов ДНК на статус метилирования генов *mQTL* [28], аллель C rs4270 связан с гипометилированием *GGCT* у взрослых, а следовательно, и с увеличением экспрессии этого гена. Биоинформатический инструмент atSNP [29] позволил определить, что аллель C создает участки связывания для 5 транскрипционных факторов:

SPDEF ( $p = 7,57 \cdot 10^{-5}$ ), MYB ( $p = 7,74 \cdot 10^{-4}$ ), MYBL1 ( $p = 9,90 \cdot 10^{-4}$ ), EP300 ( $p = 4,38 \cdot 10^{-4}$ ) и NRF1 ( $p = 1,67 \cdot 10^{-4}$ ), последний из которых представляет особый интерес, поскольку именно NRF1 запускает экспрессию ключевых антиоксидантных генов в условиях оксидантного стресса. В островках Лангерганса эти эффекты особенно важны ввиду низкой обеспеченности бета-клеток антиоксидантами и, как следствие, их большей уязвимостью, по сравнению с другими тканями [30]. Концентрация перекиси водорода у больных СД2 в нашем исследовании значимо превышала соответствующие показатели контрольной группы, что было описано и в других работах. Так, T. Inoguchi et al. [31] в эксперименте на клеточных линиях доказали увеличение продукции активных форм кислорода при СД2 в эндотелии, гладкомышечных клетках сосудов и почках, используя метод спектроскопии на основе электронного парамагнитного резонанса для детекции образуемых НАДФН-оксидазой супероксид-анионов. Гиперпродукция активных форм кислорода при СД2 также была показана в бета-клетках поджелудочной железы и инсулинзависимых тканях (жировой и мышечной), с чем связывают становление инсулинорезистентности и дисфункции бета-клеток [6, 32], особенно усугубляющимися на фоне снижения антиоксидантной защиты. Так, M. Lagman et al. [33]

Таблица 5

Частоты гаплотипов *GGCT* у больных СД2 и здоровых лиц, стратифицированных по потреблению овощей и фруктов и курению

Гаплотипы изучаемых SNPs				Некурящие				Курящие			
rs38420	rs4270	rs6462210	rs28679	контроль	больные СД2	OR (95 % CI)*	<i>p</i> *	контроль	больные СД2	OR (95 % CI)*	<i>p</i> *
Потребляющие достаточно овощей и фруктов											
G	T	C	G	0,3973	0,461	1,00	—	0,4352	0,4782	1,00	—
A	T	C	A	0,183	0,1838	0,86 (0,66–1,11)	0,25	0,1731	0,1729	0,91 (0,57–1,45)	0,69
G	C	C	G	0,1632	0,1165	<b>0,62</b> <b>(0,45–0,86)</b>	<b>0,0039</b>	0,1425	0,1106	0,70 (0,39–1,25)	0,22
G	T	T	G	0,0722	0,0871	1,02 (0,69–1,49)	0,93	0,0865	0,0751	0,82 (0,43–1,58)	0,56
G	T	C	A	0,0819	0,0709	0,73 (0,49–1,08)	0,11	0,0851	0,1135	1,26 (0,69–2,27)	0,45
G	C	T	G	0,0617	0,0505	0,72 (0,46–1,12)	0,15	0,0463	0,0326	0,67 (0,23–1,95)	0,46
G	C	C	A	0,0122	0,0161	1,18 (0,44–3,19)	0,74	0,0074	0,0053	0,60 (0,08–4,55)	0,62
A	C	C	A	0,0142	0,0099	0,66 (0,20–2,19)	0,5	0,0158	0,0064	0,37 (0,04–3,16)	0,36
Общий <i>p</i> ассоциаций гаплотипов:							<b>0,041</b>	Общий <i>p</i> ассоциаций гаплотипов: 0,61			
Потребляющие недостаточно овощей и фруктов											
G	T	C	G	0,4034	0,4536	1,00	—	0,5458	0,419	1,00	—
A	T	C	A	0,1851	0,1694	0,81 (0,53–1,22)	0,31	0,1933	0,2067	1,49 (0,67–3,32)	0,34
G	C	C	G	0,1647	0,1327	0,71 (0,44–1,15)	0,17	0,0537	0,1331	3,26 (0,63–16,92)	0,16
G	T	T	G	0,0713	0,0867	1,08 (0,58–2,00)	0,81	0,0914	0,0635	0,78 (0,25–2,46)	0,68
G	C	T	G	0,0691	0,0706	0,91 (0,48–1,74)	0,78	NA	0,065	NA	NA
G	T	C	A	0,059	0,0564	0,90 (0,46–1,77)	0,76	0,0566	0,0804	1,82 (0,46–7,14)	0,39
A	C	C	A	0,02	0,0189	0,93 (0,19–4,51)	0,93	0,0391	0,0142	0,58 (0,06–5,52)	0,64
G	C	C	A	0,0236	0,0091	0,31 (0,07–1,32)	0,11	0,0106	0,009	1,30 (0,02–9,65)	0,91
Общий <i>p</i> ассоциаций гаплотипов:							0,63	Общий <i>p</i> ассоциаций гаплотипов: 0,67			

Примечания. \* Расчеты выполнены с поправкой на пол, возраст и индекс массы тела. NA — not applicable (не применимо). Полужирным выделены значимые OR и *p*. OR — отношение шансов, *p* — уровень значимости ассоциаций.

показали, что концентрация восстановленного глутатиона в плазме и эритроцитах больных СД2 была в 2 раза ниже, а уровень окисленного глутатиона в 2 раза выше, чем у здоровых лиц.

Содержание восстановленного глутатиона в плазме пациентов с СД2 в нашем исследовании значимо превышало таковое у лиц контрольной группы, что, вероятно, связано с компенсаторной трансактива-

цией генов ферментов антиоксидантной системы (в частности, *GCL* и *GSS*), в избытке образующимися активными формами кислорода [34]. Положительный эффект *GGCT* на редокс-баланс был показан только в нашей работе: SNP rs4270 ассоциирован с повышением уровня GSH у больных СД2.

По всей видимости, ассоциация полиморфизма гена *GGCT* с СД2 модулируется внешними факто-

рами: в нашем исследовании протективный эффект минорных аллелей изучаемых локусов *GGCT* был отмечен только у некурящих пациентов, ежедневно потребляющих не менее 6 порций свежих овощей и фруктов. Именно растительная пища служит природным источником витаминов и антиоксидантов, способными восполнить их эндогенный дефицит. Оценка связи потребления свежих овощей и фруктов с СД2 по данным литературы неоднозначна. Так, P. Carter et al. [35] установили, что ежедневное потребление свежих овощей и фруктов снижает риск заболевания на 14 %, тогда как H. Boeing et al. [36] исключили наличие прямой связи между количеством потребляемой растительной пищи и риском СД2. A.J. Cooper et al. [37] рассчитали, что потребление свежих овощей, фруктов и их сочетаний снижает риск СД2 на 25, 28 и 32 % соответственно. Обратная связь между количеством растительной пищи и риском заболевания была показана в исследовании I. Muraki [38], включавшем 150 000 женщин и 35 000 мужчин, а также в метаанализе M. Li [39]. Антидиабетический эффект свежих овощей и фруктов может быть связан с тем, что, во-первых, флавоноид кверцетин, компонент растительной пищи, повышает экспрессию ферментов антиоксидантного профиля, а также стимулирует транслокацию транспортеров глюкозы-4 (GLUT4) к мембранам миоцитов и ингибирует глюкозо-6-фосфатазу в печени, способствуя нормализации гликемического профиля [40]. Во-вторых, показано, что кверцетин и полиоксифенолы растительной пищи активируют экспрессию Nrf2, запускающего транскрипцию ключевых антиоксидантных ферментов в ответ на активные формы кислорода и подавляющего провоспалительные эффекты ядерного транскрипционного фактора  $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ ) [41].

Протективный эффект *GGCT* также отсутствовал у всех курящих участников исследования. Токсины табачного дыма оказывают прямое токсическое действие на ткань поджелудочной железы даже при пассивном курении [42, 43], подавляя секрецию инсулина [44]. Кроме того, никотин индуцирует липолиз, воспаление и оксидантный стресс в жировой ткани с последующим развитием дислипидемии, инсулинорезистентности и нарушением сигнализации инсулина [44, 45]. В то же время курение увеличивает риск абдоминаль-

ного ожирения за счет усиления инактивирующего гидроксирования эстрадиола (антиэстрогенный эффект) [44]. Таким образом, комбинация курения, усиливающего прооксидантный статус клеток, и недостаточного потребления свежей растительной пищи, естественного источника антиоксидантов, создает тот самый отрицательный метаболический фундамент, на котором происходит манифестация СД2 или декомпенсация уже имеющегося заболевания.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В проведенном исследовании впервые установлена ассоциация SNP rs4270 гена *GGCT* с пониженным риском развития СД2. Механизм взаимосвязи данного варианта с заболеванием объясняется увеличением экспрессии гена *GGCT* у носителей минорного аллеля С, что проявляется повышением концентрации восстановленного глутатиона в плазме крови. Данная ассоциация модулируется антиоксидантными эффектами внешней среды: потребление свежих овощей и фруктов и отказ от курения способствуют проявлению защитных эффектов *GGCT* в отношении риска развития заболевания. Полученные данные открывают перспективы для дальнейшего изучения генетико-биохимических особенностей метаболизма глутатиона при СД2 и поиска новых молекулярных мишеней для терапии и профилактики болезни.

*Источник финансирования.* Исследование выполнено при финансовой поддержке ФГБОУ ВО КГМУ Минздрава России.

*Конфликт интересов.* Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

*Благодарности.* Авторы выражают благодарность главному врачу Курской городской клинической больницы скорой медицинской помощи В.Е. Ивакину, а также главному врачу Курской областной станции переливания крови А.П. Ковалеву за оказанную помощь в организации сбора клинического материала.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Cho NH, Shaw JE, Karuranga S, et al. IDF IDF Diabetes atlas: global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabe-*

- tes Res Clin Pract.* 2018;138:271-281. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2018.02.023>.
2. Дедов И.И., Шестакова М.В., Викулова О.К. и др. Сахарный диабет в Российской Федерации: распространенность, заболеваемость, смертность, параметры углеводного обмена и структура сахароснижающей терапии по данным федерального регистра сахарного диабета, статус 2017 г. // Сахарный диабет. — 2018. — Т. 21. — № 3. — С. 144-159. [Dedov II, Shestakova MV, Vikulova OK, et al. Diabetes mellitus in Russian Federation: prevalence, morbidity, mortality, parameters of glycaemic control and structure of glucose lowering therapy according to the Federal Diabetes Register, status 2017. *Diabetes mellitus.* 2018;21(3):144-159. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.14341/dm9686>.
  3. Buniello A, MacArthur JAL, Cerezo M, et al. The NHGRI-EBI GWAS Catalog of published genome-wide association studies, targeted arrays and summary statistics 2019. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(D1):D1005-D1012. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1120>.
  4. Shah M, Vella A. What is type 2 diabetes? *Medicine.* 2014;42(12):687-691. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2014.09.013>.
  5. DeFronzo RA. Banting Lecture. From the triumvirate to the ominous octet: a new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes.* 2009;58(4):773-795. <https://doi.org/10.2337/db09-9028>.
  6. Newsholme P, Cruzat VF, Keane KN, et al. Molecular mechanisms of ROS production and oxidative stress in diabetes. *Biochem J.* 2016;473(24):4527-4550. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160503C>.
  7. Malik VS, Popkin BM, Bray GA, et al. Sugar-sweetened beverages, obesity, type 2 diabetes mellitus, and cardiovascular disease risk. *Circulation.* 2010;121(11):1356-1364. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.876185>.
  8. 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):540-551. <https://doi.org/10.1111/joim.12289>.
  9. Orłowski M, Meister A. The gamma-glutamyl cycle: a possible transport system for amino acids. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1970;67(3):1248-1255. <https://doi.org/10.1073/pnas.67.3.1248>.
  10. Azarova I, Bushueva O, Konoplya A, Polonikov A. Glutathione S-transferase genes and the risk of type 2 diabetes mellitus: role of sexual dimorphism, gene-gene and gene-smoking interactions in disease susceptibility. *J Diabetes.* 2018;10(5):398-407. <https://doi.org/10.1111/1753-0407.12623>.
  11. Азарова Ю.Э., Клесова Е.Ю., Конопля А.И. Роль полиморфизмов генов глутаматцистеинлигазы в развитии сахарного диабета 2 типа у жителей Курской области // Научный результат. Медицина и фармация. — 2018. — Т. 4. — № 1. — С. 39-52. [Azarova YuE, Klyosova EYu, Konoplya AI. The role of polymorphisms of glutamate-cysteine ligase in type 2 diabetes mellitus susceptibility in Kursk population. *Research result. Medicine and pharmacy.* 2018;4(1):39-52. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.18413/2313-8955-2018-4-1-39-52>.
  12. Organization WT. Global report on diabetes: executive summary (No. WHO/NMH/NVI/16.3). World Health Organization; 2016. <https://doi.org/10.30875/3fa8639a-en>.
  13. Xu Z, Taylor JA. SNPinfo: integrating GWAS and candidate gene information into functional SNP selection for genetic association studies. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(Web Server Issue):W600-605. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp290>.
  14. Пономаренко И.В. Отбор полиморфных локусов для анализа ассоциаций при генетико-эпидемиологических исследованиях // Научный результат. Медицина и фармация. — 2018. — Т. 4. — № 2. — С. 40-54. [Ponomarenko IV. Selection of polymorphic loci for association analysis in genetic-epidemiological studies. *Research result. Medicine and pharmacy.* 2018;4(2):40-54. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.18413/2313-8955-2018-4-2-0-5>.
  15. Skol AD, Scott LJ, Abecasis GR, Boehnke M. Joint analysis is more efficient than replication-based analysis for two-stage genome-wide association studies. *Nat Genet.* 2006;38(2):209-213. <https://doi.org/10.1038/ng1706>.

16. Solé X, Guinó E, Valls J, et al. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics*. 2006;22(15):1928-1929. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl268>.
17. Hunt SE, McLaren W, Gil L, et al. Ensembl variation resources. *Database (Oxford)*. 2018;2018. <https://doi.org/10.1093/database/bay119>.
18. Liu Y, Hyde AS, Simpson MA, Barycki JJ. Emerging regulatory paradigms in glutathione metabolism. *Adv Cancer Res*. 2014;122:69-101. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420117-0.00002-5>.
19. Bachhawat AK, Yadav S. The glutathione cycle: glutathione metabolism beyond the  $\gamma$ -glutamyl cycle. *IUBMB Life*. 2018;70(7):585-592. <https://doi.org/10.1002/iub.1756>.
20. Kageyama S, Ii H, Taniguchi K, et al. Mechanisms of tumor growth inhibition by depletion of  $\gamma$ -glutamylcyclotransferase (GGCT): a novel molecular target for anticancer therapy. *Int J Mol Sci*. 2018;19(7). pii: E2054. <https://doi.org/10.3390/ijms19072054>.
21. Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(D1):D607-D613. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1131>.
22. The Gene Ontology Consortium. The gene ontology resource: 20 years and still going strong. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(D1):D330-D338. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1055>.
23. Lin Z, Xiong L, Zhou J, et al.  $\gamma$ -Glutamylcyclotransferase knockdown inhibits growth of lung cancer cells through G0/G1 phase arrest. *Cancer Biother Radiopharm*. 2015;30(5): 211-216. <https://doi.org/10.1089/cbr.2014.1807>.
24. Zhang W, Chen L, Xiang H, et al. Knockdown of GGCT inhibits cell proliferation and induces late apoptosis in human gastric cancer. *BMC Biochem*. 2016;17(1):19. <https://doi.org/10.1186/s12858-016-0075-8>.
25. Dong J, Zhou Y, Liao Z, et al. Role of  $\gamma$ -glutamyl cyclotransferase as a therapeutic target for colorectal cancer based on the lentivirus-mediated system. *Anticancer Drugs*. 2016;27(10):1011-1020. <https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000000407>.
26. Matsumura K, Nakata S, Taniguchi K, et al. Depletion of  $\gamma$ -glutamylcyclotransferase inhibits breast cancer cell growth via cellular senescence induction mediated by CDK inhibitor upregulation. *BMC Cancer*. 2016;16(1):748. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2779-y>.
27. GTex Portal. Current Release (V8) [cited 2019 August 25]. Available from: <https://www.gtexportal.org>.
28. Gaunt TR, Shihab HA, Hemani G, et al. Systematic identification of genetic influences on methylation across the human life course. *Genome Biol*. 2016;17:61. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-0926-z>.
29. Zuo C, Shin S, Keleş S. atSNP: transcription factor binding affinity testing for regulatory SNP detection. *Bioinformatics*. 2015;31(20):3353-3355. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv328>.
30. Gerber PA, Rutter GA. The role of oxidative stress and hypoxia in pancreatic beta-cell dysfunction in diabetes mellitus. *Antioxid Redox Signal*. 2017;26(10):501-518. <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6755>.
31. Inoguchi T, Li P, Umeda F, et al. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C - dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes*. 2000;49(11):1939-1945. <https://doi.org/10.2337/diabetes.49.11.1939>.
32. Brownlee M. A radical explanation for glucose-induced beta cell dysfunction. *J Clin Invest*. 2003;112(12):1788-1790. <https://doi.org/10.1172/jci200320501>.
33. 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118436>.
34. Halliwell B, Gutteridge J. Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press Oxford; 1999.
35. 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. <https://doi.org/10.1136/bmj.c4229>.

36. 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):637-663. <https://doi.org/10.1007/s00394-012-0380-y>.
37. 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):1293-1300. <https://doi.org/10.2337/dc11-2388>.
38. 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. <https://doi.org/10.1136/bmj.f5001>.
39. 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. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2014-005497>.
40. 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. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.01.015>.
41. 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):1525-1533. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.04.012>.
42. Rimm EB, Chan J, Stampfer MJ, et al. Prospective study of cigarette smoking, alcohol use, and the risk of diabetes in men. *BMJ.* 1995;310(6979):555-559. <https://doi.org/10.1136/bmj.310.6979.555>.
43. Zhang L, Curhan GC, Hu FB, et al. Association between passive and active smoking and incident type 2 diabetes in women. *Diabetes Care.* 2011;34(4):892-897. <https://doi.org/10.2337/dc10-2087>.
44. Zhu P, Pan XF, Sheng L, et al. Cigarette smoking, diabetes, and diabetes complications: call for urgent action. *Curr Diab Rep.* 2017;17(9):78. <https://doi.org/10.1007/s11892-017-0903-2>.
45. Rajagopalan S, Brook RD. Air pollution and type 2 diabetes: mechanistic insights. *Diabetes.* 2012;61(12):3037-3045. <https://doi.org/10.2337/db12-0190>.

✉ Информация об авторах

**Юлия Эдуардовна Азарова** — канд. мед. наук, доцент кафедры биологической химии, зав. лабораторией биохимической генетики и метаболомики НИИ генетической и молекулярной эпидемиологии. ФГБОУ ВО КГМУ Минздрава России, Курск. E-mail: azzzzar@yandex.ru.

**Елена Юрьевна Клёсова** — инженер-биотехнолог, лаборатория биохимической генетики и метаболомики НИИ генетической и молекулярной эпидемиологии. ФГБОУ ВО КГМУ Минздрава России, Курск. E-mail: eclass@yandex.ru.

**Михаил Иванович Чурилин** — ассистент, кафедра инфекционных болезней и эпидемиологии. ФГБОУ ВО КГМУ Минздрава России, Курск. E-mail: mpmi2@yandex.ru.

**Татьяна Александровна Самгина** — канд. мед. наук, доцент, доцент кафедры хирургических болезней № 2. ФГБОУ ВО КГМУ Минздрава России, Курск. E-mail: tass@list.ru.

**Александр Иванович Конопля** — д-р мед. наук, профессор, профессор кафедры биологической химии. ФГБОУ ВО КГМУ Минздрава России, Курск. E-mail: konoplya51@mail.ru.

**Алексей Валерьевич Полоников** — д-р мед. наук, профессор, профессор кафедры биологии, медицинской генетики и экологии, зав. лабораторией статистической генетики и биоинформатики, НИИ генетической и молекулярной эпидемиологии. ФГБОУ ВО КГМУ Минздрава России, Курск. E-mail: polonikov@rambler.ru.

✉ Authors and affiliations

**Iuliia E. Azarova** — MD, PhD, Associate Professor of Department of Biological Chemistry of KSMU, Head of Laboratory of Biochemical Genetics and Metabolomics of Research Institute for Genetic and Molecular Epidemiology. Kursk State Medical University, Kursk, Russia. E-mail: azzzzar@yandex.ru.

**Elena Yu. Klyosova** — biotechnologist of Laboratory of Biochemical Genetics and Metabolomics of Research Institute for Genetic and Molecular Epidemiology. Kursk State Medical University, Kursk, Russia. E-mail: eclass@yandex.ru.

**Mikhail I. Churilin** — Assistant Lecturer of Department of Infectious Diseases. Kursk State Medical University, Kursk, Russia. E-mail: mpmi2@yandex.ru.

**Tatiana A. Samgina** — MD, PhD, Associate Professor, Associate Professor of Department of Surgical Diseases No. 2. Kursk State Medical University, Kursk, Russia. E-mail: tass@list.ru.

**Alexander I. Konoplya** — MD, PhD, Professor, Professor of Department of Biological Chemistry. Kursk State Medical University, Kursk, Russia. E-mail: konoplya51@mail.ru.

**Alexey V. Polonikov** — MD, PhD, Professor, Professor of Department of Biology, Medical Genetics and Ecology, Head of Laboratory of Statistical Genetics and Bioinformatics of Research Institute for Genetic and Molecular Epidemiology. Kursk State Medical University, Kursk, Russia. E-mail: polonikov@rambler.ru.