

Marta Fichna<sup>1, 2</sup>, Izabela Krzyśko-Pieczka<sup>3</sup>, Magdalena Żurawek<sup>2</sup>, Bogda Skowrońska<sup>3</sup>, Anna Gertig-Kolasa<sup>3</sup>, Piotr Fichna<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Katedra i Klinika Endokrynologii, Przemiany Materii i Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

<sup>2</sup>Instytut Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

<sup>3</sup>Klinika Diabetologii i Otyłości Wieku Rozwojowego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

# Brak związku polimorfizmów genu *HSD11B1* z otyłością i cechami zespołu metabolicznego u polskich dzieci i młodzieży

Lack of association of the *HSD11B1* gene polymorphisms with obesity and other traits of metabolic syndrome in children and adolescents

Artykuł jest tłumaczeniem pracy:

Fichna M, Krzyśko-Pieczka I, Żurawek M, Skowrońska B, Gertig-Kolasa A, Fichna P. Lack of association of the *HSD11B1* gene polymorphisms with obesity and other traits of metabolic syndrome in children and adolescents. *Clin Diabetol* 2016; 5, 6: 178–184. DOI: 10.5603/DK.2016.0031.

Należy cytować wersję pierwotną.

## STRESZCZENIE

**Wstęp.** Otyłość i związane z nią zaburzenia wchodzące w skład zespołu metabolicznego (MetS) są coraz częściej rozpoznawane u dzieci i młodzieży. Cechy kliniczne definiujące MetS stwierdza się również u chorych z nadmiarem glikokortykosteroidów. Ponieważ w otyłości, jak również w MetS nie wykazano jednoznacznie hiperkortyzolemii, podjęto badania miejscowych modulatorów działania kortyzolu. Dehydrogenaza  $11\beta$ -hydroksysteroidowa typu 1, kodowana przez gen *HSD11B1*, kontroluje tkankową dostępność kortyzolu poprzez jego regenerację z nieaktywnego kortyzonu. Indywidualna ekspresja *HSD11B1* oraz aktywność enzymu mogą zależeć od polimorficznych wariantów sekwencji genu i wiązać się z patogenezą MetS. Niniejsze badanie miało na celu ocenę możliwego związku polimorfizmów genu *HSD11B1* z wcześniej występującą otyłością i cechami MetS u polskich dzieci i młodzieży. **Pacjenci i metody.** Badaniem objęto 258 otyłych dzieci (136 dziewczynek) w wieku  $12,3 \pm 3,6$  roku, z nad-

mierną masą ciała od  $7,1 \pm 3,8$  roku. U wszystkich wykonano pomiary antropometryczne i ocenę ciśnienia tętniczego, podstawowe analizy biochemiczne oraz dostny test tolerancji glukozy. Genotypowanie *HSD11B1* rs12086634, rs846910, rs4844880 oraz rs3753519 przeprowadzono u otyłych chorych i porównano z 568 zdrowymi szczupłymi dawcami krwi.

**Wyniki.** Średni względny wskaźnik masy ciała w grupie otyłych wynosił  $164,7 \pm 27,1\%$ . Nadciśnienie wykryto u 12,4%, nieprawidłową glikemię na czczo u 8,9%, upośledzoną tolerancję glukozy u 10,8%, cukrzycę u 2,7%, a dyslipidemię u 31,4% dzieci i młodzieży. Nie wykazano istotnej różnicy częstości występowania żadnego z badanych polimorfizmów genu *HSD11B1* między osobami otyłymi i szczupłymi. Zespół metaboliczny rozpoznano u 27,6% z 203 otyłych dzieci w wieku 10–18 lat. Dalsze analizy związku wariantów genu *HSD11B1* i cech MetS z podziałem na genotypy nie potwierdziły zwiększonej podatności do rozwoju wczesnej hiperglikemii, dyslipidemia czy nadciśnienia u nosicieli specyficznych genotypów rs4844880, rs846910, rs3753519 lub rs12086634 ( $p \geq 0,05$  we wszystkich testach).

**Wniosek.** Wyniki przeprowadzonego badania nie potwierdzają związku polimorfizmów genu *HSD11B1* z wczesnym rozwojem otyłości ani innych cech zespołu metabolicznego.

**Słowa kluczowe:** otyłość wieku dziecięcego, gen *HSD11B1*, polimorfizm, kortyzol, zespół metaboliczny

Adres do korespondencji:

dr hab. n. med. Marta Fichna

Katedra i Klinika Endokrynologii, Przemiany Materii i Chorób Wewnętrznych

Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego

u. Przybyszewskiego 49, 60–355 Poznań

Tel.: +48 61 869 13 30

Faks: +48 869 16 82

e-mail: mfichna@man.poznan.pl

Tłumaczenie: lek. Małgorzata Kamińska

Nadesłano: 23.08.2016

Przyjęto do druku: 07.03.2017

**ABSTRACT**

**Introduction.** Obesity and its related disorders, clustered into metabolic syndrome (MetS), are increasingly diagnosed in children and adolescents. Clinical features, which define MetS are also encountered in patients with glucocorticoid excess. Since no evident hypercortisolaemia was detected in obesity and MetS, investigations turned to the local modulators of cortisol action.  $11\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1, encoded by *HSD11B1* gene, controls tissue availability of cortisol by its regeneration from inert cortisone. Changes in *HSD11B1* expression and enzyme activity may be influenced by its sequence variants and seem implicated in MetS pathogenesis. Our study was designed to evaluate plausible association of the *HSD11B1* polymorphisms with early-onset obesity and features of MetS in Polish children and adolescents.

**Material and methods.** The study comprised of 258 obese children (136 females), aged  $12.3 \pm 3.6$  years, with excessive body mass lasting  $7.1 \pm 3.8$  years. Anthropometric and blood pressure measurements, baseline biochemical analyses and oral glucose tolerance test were performed in all participants. Genotyping of the *HSD11B1* variants rs12086634, rs846910, rs4844880, and rs3753519 was conducted in obese youth and compared with 568 lean blood donors.

**Results.** Mean relative body mass index in obese cohort was  $164.7 \pm 27.1\%$ . Hypertension was detected in 12.4%, impaired fasting glucose in 8.9%, impaired glucose tolerance in 10.8%, diabetes in 2.7%, and dyslipidemia in 31.4% children and adolescents. None of the studied *HSD11B1* polymorphisms displayed significant difference in frequency between obese and lean individuals. MetS was diagnosed in 27.6% of 203 patients with obesity aged 10–18 years. Further genotype-stratified analyses of relationship between *HSD11B1* variants and particular features of MetS did not confirm increased susceptibility to develop early-onset hyperglycaemia, dyslipidaemia and hypertension in carriers of specific genotypes at rs4844880, rs846910, rs3753519, and rs12086634 ( $p \geq 0.05$  in all tests).

**Conclusion.** Our study does not support the implication of the *HSD11B1* polymorphisms in early-onset obesity and other features of MetS.

**Key words:** childhood obesity, *HSD11B1* gene, polymorphism, cortisol, metabolic syndrome

**Wstęp**

Otyłość jest narastającym problemem systemu opieki zdrowotnej we współczesnych społeczeństwach. Coraz częściej dotyczy on najmłodszych grup wiekowych i prowadzi do wielu powikłań, co w efekcie przyczynia się do zwiększonej chorobowości i umieralności [1]. Zespół metaboliczny (MetS, *metabolic syndrome*) to współwystępowanie cech związanych z otyłością powodujących zwiększenie ryzyka cukrzycy typu 2 (T2D, *type 2 diabetes*) i chorób sercowo-naczyniowych [2]. U osób, u których MetS rozwija się w dzieciństwie, ryzyko rozwoju miażdżycy i cukrzycy jest 2-, a nawet 3-krotnie większe niż u tych, u których MetS w młodości nie występował [1]. Należy zwrócić uwagę na fakt, że typowe cechy MetS stwierdza się również u chorych z zaburzeniami związanymi z nadmiarem glikokortykosteroidów, tj. z zespołem Cushinga o podłożu endo- lub egzogennym [3, 4]. Te obserwacje kliniczne stały się impulsem do szczegółowych badań dotyczących osi podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczowej (HPA, *hypothalamo-pituitary-adrenal*) u chorych z otyłością i MetS. Jednak mimo pewnych wykładników wzmożonej reaktywności osi HPA na bodźce fizjologiczne i farmakologiczne nie stwierdzono u tych osób ciągłego podwyższenia stężenia kortyzolu [5].

Identyfikacja enzymów, które modulują działanie kortyzolu w tkankach, otworzyła drogę nowym hipotezom na temat roli glikokortykosteroidów w zaburzeniach sercowo-naczyniowych. Dehydrogenaza  $11\beta$ -hydroxysteroidowa typu 1 ( $11\beta$ -HSD1, *type 1 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase*) działa głównie jako ketoreduktaza i kontroluje lokalną dostępność kortyzolu poprzez jego regenerację z postaci nieaktywnej na drodze reakcji zależnej od NADPH [6]. Ekspresję tego enzymu, kodowanego przez gen *HSD11B1*, stwierdza się w wielu narządach — w wątrobie, tkance tłuszczowej, mięśniach i ośrodkowym układzie nerwowym — gdzie wzmacnia działanie glikokortykosteroidów [7]. Różny stopień aktywności enzymu  $11\beta$ -HSD1 może zwiększać lub osłabiać lokalny wpływ glikokortykosteroidów. U transgenicznych myszy z wybiórczą nadekspresją enzymu  $11\beta$ -HSD1 w tkance tłuszczowej występowały cechy MetS — otyłość trzewna, insulinooporność i hiperlipidemia [8]. Z kolei myszy, u których w sposób wybiórczy wyeliminowano lub zablokowano ten enzym, wydawały się chronione przed szkodliwym wpływem diety wysokotłuszczowej [9, 10]. U ludzi potwierdzono zwiększoną ekspresję enzymu  $11\beta$ -HSD1 w tkance tłuszczowej u osób otyłych z insulinoopornością [11]. Odnotowano dodatnią korelację między wskaźnikiem masy ciała (BMI, *body mass index*)

a mRNA genu *HSD11B1* w tkance tłuszczowej [11, 12]. U kobiet z najwyższą aktywnością enzymu w tkance tłuszczowej trzewnej stwierdzono zwiększone wskaźniki lipolizy i insulinooporności oraz najniższe stężenia cholesterolu frakcji HDL i adiponektyny [13].

Dlatego można przypuszczać, że wczesny rozwój MetS może się wiązać ze zmianami w ekspresji genu *HSD11B1* i aktywności enzymu. Jak wykazano w badaniach *in vitro* i potwierdzono w badaniach *in vivo*, aktywność transkrypcyjna i związana z tym ekspresja enzymu 11 $\beta$ -HSD1 może być uzależniona od jednonukleotydowych polimorfizmów (SNP, *single nucleotide polymorphism*) w genie *HSD11B1* [14–17]. U Indian Pima warianty rs846910 i rs12086634 wiązały się istotnie z T2D oraz wychwytem glukozy w klamrze euglikemiczno-hiperinsulinemicznej, jednak nie wykazano bezpośredniej zależności ze wskaźnikiem BMI [18]. W koreańskim badaniu stwierdzono możliwy związek polimorfizmów genu *HSD11B1* z MetS, glikemią na czczo i BMI [19]. W populacji europejskiej opisano zależność między wariantami rs846910 i rs12086634 a ryzykiem MetS u włoskich kobiet [15]. Ponadto opisywano związek drugiego wariantu z podwyższoną ekspresją mRNA genu *HSD11B1* w podskórnej tkance tłuszczowej i nasileniem przemiany kortyzonu w kortyzol ocenianych na podstawie dobowej zbiórki moczu [15]. U hiszpańskich dzieci obecność wariantu rs3753519 wiązała się z otyłością, jednak nie stwierdzono jego wpływu na homeostazę glukozy [20]. W małym amerykańskim badaniu u dzieci wykryto związek między insercją adeniny w intronie 3 genu *HSD11B1* (ins4436A, rs45487298) i zwiększeniem wskaźnika BMI, współczynnika talia–biodra i insulinoopornością [21]. W przeprowadzonej w późniejszym terminie analizie u młodych Amerykanów pochodzenia meksykańskiego potwierdzono, że wariant rs846910 wiąże się z wartością wskaźnika insulinooporności HOMA-IR (*Homeostatic Model Assessment of Insulin Resistance*) i stężeniem krążących triglicerydów, ale nie wiąże się z otyłością [22]. Natomiast w chińskim badaniu powiązano kilka wariantów genu *HSD11B1* z otyłością u dzieci i jej kardiometabolicznymi powikłaniami — nadciśnieniem tętniczym, hipercholesterolemią i hiperglikemią [23]. Z kolei w badaniu przeprowadzonym u Holendrów w podeszłym wieku nie stwierdzono związku między genem *HSD11B1* a budową ciała i metabolizmem glukozy [24]. Jednak można oczekiwać, że potencjalny wpływ czynników genetycznych będzie silniejszy w przypadku zaburzeń ujawniających się we wczesnym okresie życia. Mając to na uwadze, przedstawione badanie zaprojektowano w celu oceny możliwego związku polimorfizmów genu *HSD11B1* z wczesnym rozwojem otyłości i innymi cechami zespołu metabolicznego u polskich dzieci i nastolatków.

## Pacjenci i metody

Do badania włączono 258 niespokrewnionych dzieci (136 dziewcząt, 122 chłopców) skierowanych do Kliniki Pediatrii i Otyłości Wieku Rozwojowego Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu z powodu otyłości. Średnia wieku  $\pm$  odchylenie standardowe (SD, *standard deviation*) wynosiła  $12,3 \pm 3,6$  roku, a średni okres utrzymywania się nadmiernej masy ciała wynosił  $7,1 \pm 3,8$  roku. Ocena dojrzewania płciowego z zastosowaniem skali Tannera wykazała stopień 1. dojrzałości płciowej u 22,4% uczestników badania, stopień 2. u 19,4%, stopień 3. u 14,7%, stopień 4. u 17,4% i stopień 5. u 26,0% uczestników. Dzieci, u których otyłość była spowodowana zaburzeniami hormonalnymi, stosowanym leczeniem lub wiązała się z określonymi zespołami chorobowymi, wykluczono z badania. Od rodziców młodszych dzieci i uczestników w wieku powyżej 16 lat uzyskano zgodę na udział w badaniu. Komisja bioetyczna Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu zatwierdziła protokół badania (decyzja 233/13), a wszystkie procedury były zgodne z deklaracją helsińską.

Kontrolne próbki krwi do genotypowania pobrano od 568 zdrowych i szczupłych dawców krwi rekrutowanych z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa. Średni wiek osób z grupy kontrolnej wynosił  $38,1 \pm 10,2$  roku, a średni wskaźnik BMI —  $23,6 \pm 1,3$  kg/m<sup>2</sup>.

Ocena kliniczna otyłych pacjentów obejmowała pomiar masy ciała i wzrostu za pomocą skalibrowanego stacjonarnego stadiometru oraz wagi elektronicznej. Wskaźnik BMI obliczono jako stosunek masy ciała [kg] do kwadratu wzrostu [m<sup>2</sup>]. Na potrzeby tego badania otyłość definiowano jako wartość wskaźnika BMI większą lub równą wartości 95. percentyla BMI dla danego wieku (tj. odchylenie standardowe BMI > 2) według siatek centylowych dla polskiej populacji [25]. Względny wskaźnik masy ciała (RBMI, *relative body mass index*) obliczano jako stosunek wartości wskaźnika BMI u danej osoby do wartości 50. percentyla BMI dla wieku i płci [26]. U wszystkich uczestników zmierzono również obwód talii i porównano otrzymany wynik z wartościami na polskich siatkach centylowych dla dzieci i młodzieży [27]. Ciśnienie tętnicze mierzono w 3 kolejnych dniach między godzinami 9:00 a 11:00, w pozycji siedzącej po 10-minutowym odpoczynku, za pomocą zwalidowanego sfigmomanometru oscylometrycznego z odpowiednim rozmiarem mankieta. Nadciśnienie tętnicze definiowano jako średnią wartość z 3 pomiarów przekraczającą 95. percentyl dla wieku i płci [28].

Analizy biochemiczne wymagały pobierania krwi rano po całonocnym poście. Dodatkowo u wszystkich uczestników badania wykonano standardowy 2-godzinny doustny test tolerancji glukozy (OGTT, *ora/*

*glucose tolerance test*), w którym oceniono glikemię i insulinę po podaniu 1,75 g glukozy/kg (maks. 75 g). Badania biochemiczne obejmowały oznaczenia standardowymi metodami enzymatycznymi za pomocą automatycznego analizatora chemicznego Olympus AU680 (Beckman Coulter Inc, Miami, FL, USA) stężeń glukozy, cholesterolu całkowitego, cholesterolu frakcji HDL i triglicerydów. Stężenie insuliny w surowicy mierzono metodą immunoluminescencyjną (Architect System, Santa Clara, USA).

Zaburzenia tolerancji glukozy definiowano na podstawie wytycznych *International Society for Paediatric and Adolescent Diabetes* (ISPAD) [29]. Wskaźnik HOMA-IR obliczano według wzoru: stężenie insuliny w surowicy na czczo (mJ./l)  $\times$  stężenie glukozy w surowicy na czczo (mmol/l)/22,5. Do obliczania stężenia cholesterolu frakcji LDL stosowano wzór Friedewalda. W celu rozpoznania zespołu metabolicznego stosowano kryteria diagnostyczne *International Diabetes Federation* (IDF) dla dzieci i młodzieży w przypadku osób w wieku 10–15 lat, a u osób w wieku 16 lat i starszych stosowano kryteria dla dorosłych [2, 30].

### Genotypowanie

Genomowe DNA ekstrahowano z krwi obwodowej, stosując zestaw Genra Puregene Blood Kit (Qiagen, Hilden, Niemcy). Genotypowanie SNP genu *HSD11B1*: rs4844880, rs846910, rs3753519 i rs12086634 przeprowadzono przez analizę dyskryminacyjną alleli przy użyciu aparatu do reakcji polimerazowej w czasie rzeczywistym 7900HT Real-Time PCR System i zatwierdzonych, dostępnych komercyjnie oznaczeń do genotypowania TaqMan SNP Genotyping (odpowiednio C\_2502442\_10, C\_8887157\_10, C\_27474627\_10 i C\_22275467\_10) zgodnie z warunkami zalecanymi przez producenta (Applied Biosystems, Foster City, Kanada). Do zbierania i analizowania danych używano modułu do analizy dyskryminacyjnej alleli oprogramowania SDS, wersja 2.3 (Applied Biosystems). W 8% próbek genotypowanie potwierdzono przez bezpośrednie sekwencjonowanie DNA przy użyciu gotowego zestawu BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (ABI Prism 3730 Genetic Analyzer, Foster City, Kanada). Próbkę z potwierdzonymi genotypami użyto jako próbek kontrolnych we wszystkich trakcjach, a ponadto 10% zaślepiono i poddano ponownemu genotypowaniu w celu oceny dokładności oznaczeń.

### Analiza statystyczna

Analizy statystyczne przeprowadzono za pomocą oprogramowania GraphPad Prism 6.0c (GraphPad Software, La Jolla, Kanada). Dane ilościowe przedstawiono jako średnie  $\pm$  SD oraz mediany i zakresy międ-

zdykwartylowe, a dane kategoryczne — jako odsetki. Równowagę Hardy'ego-Weinberga genotypowanych SNP oceniano, stosując kalkulator onlinowy opracowany na Uniwersytecie Tufts (Medford, Massachusetts, USA). Normalność rozkładu danych sprawdzano za pomocą testu Shapiro-Wilka. Z uwagi na małą częstość homozygot rzadszych alleli badanych SNP na potrzeby analiz statystycznych osoby te dołączono do grupy heterozygot i taką połączoną grupę porównywano z homozygotami najczęściej występujących alleli typu dzikiego. Dane o normalnym rozkładzie stratyfikowane w zależności od wyniku genotypowania porównywano następnie, stosując test t-Studenta dla prób niezależnych (niesparowanych), natomiast dane, których rozkład nie spełniał kryterium normalności, analizowano za pomocą nieparametrycznego testu Manna-Whitneya. Wartości  $p < 0,05$  w testach dwustronnych uważano za statystycznie istotne. Zakładając, że iloraz szans (OR, *odds ratio*) wynosi 1,5 przy poziomie istotności 0,05, obliczono moc badania w wykrywaniu efektu, korzystając z kalkulatora PS Power and Sample Size wersja 2.1.30 (Vanderbilt University, Nashville, Tennessee, USA).

### Wyniki

Średni wskaźnik RBMI w badanej kohorcie wynosił  $164,7 \pm 27,1\%$ . Nadciśnienie tętnicze wykryto u 12,4% otyłych osób. Na podstawie wyników OGTT stwierdzono prawidłową tolerancję glukozy u 200 (77,5%) badanych, nieprawidłową glikemię na czczo — u 23 (8,9%), upośledzoną tolerancję glukozy — u 28 (10,8%), cukrzycę — u 7 (2,7%) dzieci i młodzieży. Średnia wartość wskaźnika HOMA-IR przekraczała 3,0, co wskazuje na powszechne występowanie insulinooporności w tej kohorcie. Dyslipidemię definiowaną zgodnie z kryteriami diagnostycznymi MetS opracowanymi przez IDF stwierdzono u 81 (31,4%) uczestników badania. Szczegółowe wyniki analiz biochemicznych przedstawiono w tabeli 1.

Częstości występowania wszystkich badanych polimorfizmów spełniały warunki równowagi Hardy'ego-Weinberga w próbkach osób badanych i w próbkach kontrolnych ( $p \geq 0,058$ ). Niestety żaden z 4 badanych wariantów genu *HSD11B1* nie różnił się istotnie pod względem rozkładu alleli i genotypów między osobami otyłymi i szczupłymi (tab. 2).

W związku z tym, że diagnozowanie MetS zaleca się tylko u dzieci w wieku co najmniej 10 lat, autorzy dokonali przeglądu wyników w tej podgrupie pod kątem kryteriów IDF. Zespół metaboliczny rozpoznano u 56 (27,6%) spośród 203 osób w wieku 10–18 lat. Tylko w tej kohorcie wykonano dalsze badania w ramach analizy w podgrupach wydzielonych na podstawie wyniku genotypowania w celu wykrycia

Tabela 1. Charakterystyka kliniczna i biochemiczna badanej kohorty otyłych dzieci i młodzieży

	Średnia	SD	Mediana	Zakres międzykwartyłowy
RBMI (%)	164,7	27,1	160,0	144,4–179,3
Skurczowe BP [mm Hg]	114	3	108	105–117
Rozkurczowe BP [mm Hg]	71	2	67	64–76
Glikemia na czczo [mmol/l]	4,95	0,52	4,89	4,67–5,18
Insulinemia na czczo [mJ./l]	16,0	9,3	13,9	9,7–20,3
Glikemia w 2. godz. OGTT [mmol/l]	6,54	1,40	6,39	5,72–7,22
Insulinemia w 2. godz. OGTT [mJ./l]	77,7	61,8	57,8	36,6–101,5
HOMA-IR [mmol/l x mJ./l]	3,56	2,16	3,06	2,00–4,34
Triglicerydy [mmol/l]	1,39	0,77	1,16	0,92–1,64
Cholesterol całkowity [mmol/l]	4,65	0,84	4,69	4,09–5,21
Cholesterol frakcji HDL [mmol/l]	1,15	0,26	1,14	0,96–1,32
Cholesterol frakcji LDL cholesterol [mmol/l]	2,84	0,69	2,77	2,38–3,29

BP (*blood pressure*) — ciśnienie tętnicze krwi; HDL (*high-density lipoprotein*) — lipoproteiny o dużej gęstości; HOMA-IR (*Homeostatic Model Assessment of Insulin Resistance*) — wskaźnik insulinooporności mierzony w modelu homeostazy; LDL (*low-density lipoprotein*) — lipoproteiny o małej gęstości; OGTT (*oral glucose tolerance test*) — doustny test tolerancji glukozy; RBMI (*relative body mass index*) — względny wskaźnik masy ciała; SD (*standard deviation*) — odchylenie standardowe

Tabela 2. Rozkład alleli i genotypów polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP) genu *HSD11B1* u 258 dzieci i młodzieży z otyłością (OT) i u 568 szczupłych osób z grupy kontrolnej (KON)

SNP	Kohorta	Genotypy (%)			Allele (%)	
		TT	TA	AA	T	A
rs4844880	OT	166 (64,3)	83 (32,2)	9 (3,5)	415 (80,4)	101 (19,6)
	KON	385 (67,8)	157 (27,6)	26 (4,6)	927 (81,6)	209 (18,4)
	p		0,356		0,571	
rs846910		GG	GA	AA	G	A
	OT	222 (86,0)	34 (13,2)	2 (0,8)	478 (92,6)	38 (7,4)
	KON	508 (89,4)	59 (10,4)	1 (0,2)	1075 (94,6)	61 (5,4)
	p		0,201		0,113	
rs3753519		GG	GA	AA	G	A
	OT	191 (74,0)	61 (23,7)	6 (2,3)	443 (85,9)	73 (14,1)
	KON	438 (77,1)	124 (21,8)	6 (1,1)	1000 (88,0)	136 (12,0)
	p		0,294		0,218	
rs12086634		GG	GT	TT	G	T
	OT	163 (63,2)	85 (32,9)	10 (3,9)	411 (79,7)	105 (20,3)
	KON	317 (55,8)	222 (39,1)	29 (5,1)	856 (75,4)	280 (24,6)
	p		0,134		0,055	

związku między polimorfizmami genu *HSD11B1* a cechami MetS. Jednak, jak przedstawiono w tabeli 3, obliczenia te nie potwierdziły, że nosiciele określonych genotypów: rs4844880, rs846910, rs3753519 i rs12086634 mogą być bardziej podatni na wczesny rozwój hiperglikemii, dyslipidemii i nadciśnienia tętniczego ( $p \geq 0,05$  we wszystkich testach).

## Dyskusja

Mimo wcześniejszych doniesień sugerujących związek między polimorfizmami genu *HSD11B1* a oty-

łością i związanymi z nią zaburzeniami metabolicznymi autorom nie udało się potwierdzić tych obserwacji w niniejszym badaniu. Opisywano związki wariantów genu *HSD11B1* z MetS u mieszkańców południowej części Indii, natomiast związek wariantów tego genu z T2D wykryto u rdzennych Amerykanów pochodzących z plemienia Pima [18, 31]. W krajach europejskich związek z MetS stwierdzono u włoskich kobiet, natomiast niewielkie badanie przeprowadzone w Bośni wykazało korelację z ciśnieniem tętniczym, wskaźnikiem HOMA-IR i cholesterolem frakcji LDL [15, 32]. Ponadto wpływ

Tabela 3. Związek między cechami zespołu metabolicznego i polimorficznymi wariantami genu *HSD11B1* analizowanymi u 203 dzieci i młodzieży z otyłością w wieku 10–18 lat

SNP	rs4844880			rs846910			rs3753519			rs12086634			
	Genotyp		p	Genotyp		p	Genotyp		p	Genotyp		p	
	TT	TA+AA		GG	GA+AA		GG	GA+AA		TT	TG+GG		
	n	120	83	171	32	144	59	114	89				
WC < 90. pc	54	33	21	0,727	45	9	0,832	37	17	0,648	26	28	0,166
WC ≥ 90. pc	149	87	62		126	23		107	42		88	61	
FPG < 5,6 mmol/l	166	99	67	0,747	138	28	0,460	118	48	0,921	97	69	0,241
FPG ≥ 5,6 mmol/l	37	21	16		33	4		26	11		17	20	
HDL ≥ 1,03 mmol/l*	128	78	50	0,490	109	19	0,639	93	35	0,481	77	51	0,134
HDL < 1,03 mmol/l	75	42	33		62	13		51	24		37	38	
TG < 1,7 mmol/l	152	94	58	0,172	131	21	0,187	113	39	0,065	90	62	0,130
TG ≥ 1,7 mmol/l	51	26	25		40	11		31	20		24	27	
BP < 130/85 mm Hg	158	91	67	0,410	136	22	0,178	114	44	0,475	88	70	0,804
BP ≥ 130/85 mm Hg	45	29	16		35	10		30	15		26	19	

\*U chorych w wieku > 16 lat przyjęto różne wartości progowe w zależności od płci wynoszące 1,03 mmol/l dla mężczyzn i 1,29 mmol/l dla kobiet  
BP (blood pressure) — ciśnienie tętnicze krwi; FPG (fasting plasma glucose) — glikemia na czczo; HDL (high-density lipoprotein cholesterol) — cholesterol frakcji lipoprotein o dużej gęstości; SNP (single nucleotide polymorphism) — polimorfizm pojedynczego nukleotydu; TG (triglyceride) — triglicerydy; WC (waist circumference) — obwód talii; pc (percentile) — percentyl

genu *HSD11B1* na stężenie glukozy i cholesterol frakcji HDL stwierdzono w badaniu u brazylijskich kobiet o europejskich korzeniach [33]. Mimo że dane z badań u dorosłych nie potwierdzają bezpośredniego wpływu polimorfizmów genu *HSD11B1* na masę ciała, związek z otyłością i jej wskaźnikami (BMI, obwód tali, współczynnik talia–biodra) opisywano u dzieci hiszpańskich, amerykańskich i chińskich [20, 21, 23]. U hiszpańskiej młodzieży i u Amerykanów pochodzenia meksykańskiego uzyskano sprzeczne wyniki dotyczące wpływu na stężenie insuliny i jej działania [20, 22]. W drugiej z wymienionych kohort wykazano również zależność między polimorfizmem genu *HSD11B1* a stężeniem krążących triglicerydów [22].

Mimo że badanie autorów także prowadzono w grupie dzieci i młodzieży, nie wykazano w nim podobnych zależności z wariantami genu *HSD11B1*. Jednym z możliwych wyjaśnień są różnice między populacjami występujące często w badaniach asocjacyjnych, również tych dotyczących otyłości [34]. Niewystarczająca moc badania jest kolejną możliwą przyczyną, gdy weźmie się pod uwagę ograniczoną liczbę uczestników i małą częstość występowania rzadkich alleli w populacji badanej przez autorów, wynoszącą od 5,4% w przypadku A w wariacie rs846910 do 24,6% w przypadku T w wariacie rs12086634. Dlatego przyjmując OR wynoszący 1,5, moc przedstawionej analizy w wykrywaniu wpływu badanych polimorfizmów wynosiła od 49,5 do 93,2%. Również SNP analizowane w badaniu mogły mieć znaczenie. Wyboru tych polimorfizmów dokonano, opierając się na wcześniejszych danych wskazujących możliwy związek z otyłością, jednak

autorzy zwracali uwagę także na dowody z badań eksperymentalnych dotyczących ich znaczenia funkcjonalnego. Stwierdzono, że rzadkie allele G wariantu rs12086634 same lub w połączeniu z wariantem rs846910 wpływały na aktywność transkrypcyjną genu *HSD11B1*, natomiast w badaniach *in vitro* oceniających tylko aspekt czynnościowy wariantu rs846910 nie wykazano różnic w ekspresji genu *HSD11B1* ani aktywności enzymu [14–16, 18]. Ponadto wykryto hamujące działanie rzadkiego allelu A wariantu rs4844880 na transkrypcję genu [17]. Jednak badania *in vitro* zwykle koncentrują się na określonych wariantach genu analizowanych osobno, dlatego ich wyniki mogą nie odpowiadać warunkom *in vivo*, w których wpływy kilku polimorfizmów kumulują się i nakładają. Dlatego nie można wykluczyć, że warianty genu *HSD11B1* oceniane w niniejszym badaniu nie mają żadnego znaczenia czynnościowego. W istocie brak związku między polimorfizmami genu *HSD11B1* a metabolicznymi powikłaniami otyłości opisywano w dorosłych populacjach Kanadyjczyków pochodzenia francuskiego, Japończyków i Holendrów w podeszłym wieku [24, 35, 36]. I w tym przypadku na rozwój cech składowych MetS mogły wpływać inne warianty genu. W przeprowadzonym niedawno polskim badaniu wykazano związek między wariantem rs45487298 genu *HSD11B1* a samoistnym nadciśnieniem tętniczym u dorosłych [37]. Ponadto w kohorcie osób z nadciśnieniem ten polimorfizm był silnym czynnikiem predykcyjnym T2D oraz niższego stężenia krążącego cholesterol frakcji HDL, jednak tych obserwacji nie potwierdzono w grupie kontrolnej [37].

Jednocześnie we wcześniejszej analizie przeprowadzonej przez autorów u chorych z pierwotną nie-

wydolnością nadnerczy, którzy wymagają dożywotniej substytucji glikokortykosteroidów, wykazano związek wariantu rs3753519 genu *HSD11B1* ze wskaźnikiem BMI i glikemią na czczo, natomiast wariant rs12086634 korelował ze stężeniem cholesterolu [38]. Analogiczne wyniki dotyczące wariantu rs4844880, wskaźnika BMI i przyrostu masy ciała w trakcie terapii zastępczej glikokortykosteroidami uzyskano w mniejszej kohorcie węgierskiej obejmującej osobę z niewydolnością nadnerczy [39]. U tych pacjentów zwykle stosuje się hydrokortyzon identyczny z naturalną cząsteczką kortyzolu, jednak jego dawkowanie w sposób zbliżony do naturalnego rytmu dobowego wydzielania kortyzolu nadal stanowi problem. Różnice w aktywności 11 $\beta$ -HSD1 mogą zatem zwiększać podatność na niekorzystne efekty niezamierzonego stosowania zbyt dużej dawki glikokortykosteroidów w ramach terapii zastępczej. Jednak obserwacje w tej specyficznej populacji otrzymującej stale egzogenne steroidy mogą nie odnosić się do otyłych pacjentów, u których występuje endogenna regulacja osi HPA.

Podsumowując, w niniejszym badaniu nie potwierdzono roli polimorficznych wariantów genu *HSD11B1* w rozwoju otyłości i innych cech zespołu metabolicznego. Niemniej dostępne są zgodne dane z badań eksperymentalnych i klinicznych wskazujące na udział dehydrogenazy 11 $\beta$ -hydroksysteroidowej typu 1 w patogenezie chorób metabolicznych związanych z otyłością. Na aktywność enzymu mogą jednak wpływać czynniki inne niż polimorfizmy genetyczne. Modulatory działania glikokortykosteroidów w tkankach to uzasadniony i obiecujący obszar do badań w otyłości i związanych z nią zaburzeń metabolicznych.

## Podziękowania

Badanie uzyskało grant naukowy Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego (przyznanego M.F., 2013). Autorzy pragną podziękować kierownictwu i pracownikom Regionalnego Centrum Krwiodawstwa w Poznaniu za nieocenioną pomoc w pozyskiwaniu próbek kontrolnych.

## Konflikt interesów

Autorzy deklarują brak konfliktu interesów.

## PIŚMIENNICTWO

- Garanty-Bogacka B., Syrenicz M., Rać M. i wsp. Association between serum osteocalcin, adiposity and metabolic risk in obese children and adolescents. *Endokrynol. Pol.* 2013; 64: 346–352.
- Alberti K.G., Zimmet P., Shaw J. Metabolic syndrome — a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet. Med.* 2006; 23: 469–480.
- Ferrau F., Karbonits M. Metabolic comorbidities in Cushing's syndrome. *Eur. J. Endocrinol.* 2015; 173: M133–M157.
- Pisarczyk-Wiza D., Zozulińska-Ziółkiewicz D. Glikokortykosteroidy a zaburzenia metabolizmu glukozy. *Clin. Diab.* 2015; 4: 110–116.
- Incollingo Rodriguez A.C., Epel E.S., White M.L. i wsp. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysregulation and cortisol activity in obesity: A systematic review. *Psychoneuroendocrinology* 2015; 62: 301–318.
- Tomlinson J.W., Walker E.A., Bujalska I.J. i wsp. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1: a tissue-specific regulator of glucocorticoid response. *Endocr. Rev.* 2004; 25: 831–866.
- Ricketts M.L., Verhaeg J.M., Bujalska I. i wsp. Immunohistochemical localization of type 1 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in human tissues. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1998; 83: 1325–1335.
- Masuzaki H., Peterson J., Shinyama H. i wsp. A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. *Science* 2001; 294: 2166–2170.
- Kotelevtsev Y., Holmes M.C., Burchell A. i wsp. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 knockout mice show attenuated glucocorticoid-inducible responses and resist hyperglycemia on obesity or stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; 94: 14924–14929.
- Alberts P., Engblom L., Edling N. i wsp. Selective inhibition of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 decreases blood glucose concentrations in hyperglycaemic mice. *Diabetologia* 2002; 45: 1528–1532.
- Desbriere R., Vuaroqueaux V., Achard V. i wsp. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 mRNA is increased in both visceral and subcutaneous adipose tissue of obese patients. *Obesity (Silver Spring)* 2006; 14: 794–798.
- Michailidou Z., Jensen M.D., Dumesic D.A. i wsp. Omental 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1 correlates with fat cell size independently of obesity. *Obesity (Silver Spring)* 2007; 15: 1155–1163.
- Veilleux A., Rheume C., Daris M. i wsp. Omental adipose tissue type 1 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase oxoreductase activity, body fat distribution, and metabolic alterations in women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2009; 94: 3550–3557.
- Draper N., Walker, E.A., Bujalska, I.J. i wsp. Mutations in the genes encoding 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and hexose-6-phosphate dehydrogenase interact to cause cortisone reductase deficiency. *Nat. Genet.* 2003; 34: 434–439.
- Gambineri A., Tomassoni, F., Munarini, A. i wsp. A combination of polymorphisms in HSD11B1 associates with in vivo 11{beta}-HSD1 activity and metabolic syndrome in women with and without polycystic ovary syndrome. *Eur. J. Endocrinol.* 2011; 165: 283–292.
- Malavasi E.L., Kelly V., Nath N. i wsp. Functional effects of polymorphisms in the human gene encoding 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 beta-HSD1): a sequence variant at the translation start of 11 beta-HSD1 alters enzyme levels. *Endocrinology* 2010; 151: 191–202.
- Feldman K., Szappanos A., Butz H. i wsp. The rs4844880 polymorphism in the promoter region of the HSD11B1 gene associates with bone mineral density in healthy and postmenopausal osteoporotic women. *Steroids* 2012; 77: 1345–1351.
- Nair S., Lee Y.H., Lindsay R.S. i wsp. 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase type 1: genetic polymorphisms are associated with type 2 diabetes in Pima Indians independently of obesity and expression in adipocyte and muscle. *Diabetologia* 2004; 47: 1088–1095.
- Moon S.S., Lee Y.S., Kim J.G. i wsp. Relationship of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and hexose-6-phosphate dehydrogenase gene polymorphisms with metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Endocr. J.* 2011; 58: 949–959.
- Olza J., Gil-Campos M., Leis R. i wsp. A gene variant of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 is associated with obesity in children. *Int. J. Obes. (Lond)* 2012; 36: 1558–1563.
- Gelertner-Yaniv L., Feng N., Sebring N.G. i wsp. Associations between a polymorphism in the 11 beta hydroxysteroid dehy-

- drogenase type I gene and body composition. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 2003; 27: 983–986.
22. Duran-Gonzalez J., Ortiz I., Gonzales E. i wsp. Association study of candidate gene polymorphisms and obesity in a young Mexican-American population from South Texas. *Arch. Med. Res.* 2011; 42: 523–531.
  23. Ruan L.L., Xu J., Wang C.L., Zou C.C. Variants of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (*HSD11B*) gene type 1 and 2 in Chinese obese adolescents. *J. Endocrinol. Invest.* 2014; 37: 565–573.
  24. Smit P., Dekker M.J., de Jong F.J. i wsp. Lack of Association of the 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 gene 83,557insA and hexose-6-phosphate dehydrogenase gene R453Q polymorphisms with body composition, adrenal androgen production, blood pressure, glucose metabolism, and dementia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2007; 92: 359–362.
  25. Kułaga Z., Litwin M., Tkaczyk M. i wsp. Polish 2010 growth references for school-aged children and adolescents. *Eur. J. Pediatr.* 2011; 170: 599–609.
  26. Cole T.J., Freeman J.V., Preece M.A. Body mass index reference curves for the UK, 1990. *Arch. Dis. Child.* 1995; 73: 25–29.
  27. Kułaga Z., Litwin M., Zajączkowska M.M. i wsp. Porównanie wartości obwodów talii i bioder dzieci i młodzieży polskiej w wieku 7–18 lat z wartościami referencyjnymi dla oceny ryzyka sercowo-naczyniowego — wyniki wstępne projektu badawczego OLAF (PL0080). *Standardy Medyczne/Pediatrics* 2008; 5: 473–485.
  28. Kułaga Z., Litwin M., Gajda A. i wsp. Rozkłady wartości ciśnienia krwi w populacji referencyjnej dzieci i młodzieży w wieku szkolnym. *Standardy Medyczne/Pediatrics* 2010; 7: 100–111.
  29. Zeitler P., Fu J., Tandon N. i wsp. ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2014. Type 2 diabetes in the child and adolescent. *Pediatr. Diabetes* 2014; 15 (Supl. 20): 26–46.
  30. Zimmet P., Alberti K.G., Kaufman F. i wsp. The metabolic syndrome in children and adolescents — an IDF consensus report. *Pediatr. Diabetes* 2007; 8: 299–306.
  31. Gandhi K., Adhikari P., Basu A., Achappa B. Association between a 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 gene polymorphism and metabolic syndrome in a South Indian population. *Metab. Syndr. Relat. Disord.* 2013; 11: 379–402.
  32. Dujic T., Bego T., Milnar B. i wsp. Association between 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 gene polymorphisms and metabolic syndrome in Bosnian population. *Biochem. Med. (Zagreb)* 2012; 22: 76–85.
  33. Turek L.V., Leite N., Rodrigues Souza R.L. i wsp. Gender-dependent association of *HSD11B1* single nucleotide polymorphisms with glucose and HDL-C levels. *Genet. Mol. Biol.* 2014; 37: 490–495.
  34. Rosmond R. Association studies of genetic polymorphisms in central obesity: a critical review. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 2003; 27: 1141–1151.
  35. Robitaille J., Brouillette C., Houde A. i wsp. Molecular screening of the 11beta-HSD1 gene in men characterized by the metabolic syndrome. *Obes. Res.* 2004; 12: 1570–1575.
  36. Miyamoto Y., Morisaki H., Yamanaka I. i wsp. Association study of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 gene polymorphisms and metabolic syndrome in urban Japanese cohort. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2009; 85: 132–138.
  37. Hejduk P., Sakowicz S., Pietrucha T. Association between ins4436A in 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 gene and essential hypertension in Polish population. *Postepy Hig. Med. Dosw.* 2015; 69: 1245–1250.
  38. Fichna M., Żurawek M., Gryczynska M. i wsp. Polymorphic variants of the *HSD11B1* gene may be involved in adverse metabolic effects of glucocorticoid replacement therapy in Addison's disease. *Eur. J. Intern. Med.* 2016; 85: 99–104.
  39. Molnar A., Kovcsdi A., Szucs N. i wsp. Polymorphisms of the GR and *HSD11B1* genes influence body mass index and weight gain during hormone replacement treatment in patients with Addison's disease. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 2016; 85: 180–188.