

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА АПОЛИПОПРОТЕИНА E В ПОПУЛЯЦИИ  
КОРЕННЫХ ЖИТЕЛЕЙ ГОРНОЙ ШОРИИ И ЕГО АССОЦИАЦИЯ  
С ПАРАМЕТРАМИ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА

Е.В. Шахтшнейдер<sup>1</sup>, М.И. Воевода<sup>1</sup>, М.Ю. Огарков<sup>3</sup>, О.Л. Барбараш<sup>3</sup>, О.М. Поликутина<sup>3</sup>,  
Я.В. Казачек<sup>3</sup>, В.А. Баум<sup>1</sup>, Н.С. Юдин<sup>2</sup>, В.Ф. Кобзев<sup>2</sup>, А.Г. Ромащенко<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт терапии СО РАМН, Новосибирск

<sup>2</sup> Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

<sup>3</sup> Кемеровский кардиологический диспансер

Цель исследования: изучить ассоциацию полиморфизма гена апополипротеина E с параметрами углеводного обмена в популяции коренных жителей Горной Шории.

Материалы и методы: в исследование включены 40 мужчин и 80 женщин в возрасте 25–64 лет, коренные жители Горной Шории – шорцы. Полиморфизм гена апополипротеина изучен E методом, основанном на подходе [Nixson et. al., 1990]. Уровень глюкозы крови определяли стандартным энзиматическим методом.

Результаты: частота аллелей  $\epsilon_2$ ,  $\epsilon_3$ ,  $\epsilon_4$  у мужчин составила 6,5, 80,4, 13,1 %, у женщин – 7,6, 72,6, 19,8 % соответственно. Частота генотипов  $\epsilon_2/\epsilon_4$ ,  $\epsilon_2/\epsilon_3$ ,  $\epsilon_3/\epsilon_3$ ,  $\epsilon_3/\epsilon_4$ ,  $\epsilon_4/\epsilon_4$  в популяции составила 1,8, 12,4, 51,8, 31,2, 2,9 % соответственно. Средние уровни глюкозы крови натощак при генотипах  $\epsilon_2/\epsilon_4$ ,  $\epsilon_2/\epsilon_3$ ,  $\epsilon_3/\epsilon_3$ ,  $\epsilon_3/\epsilon_4$  и  $\epsilon_4/\epsilon_4$  определены 4,6±0,3 мг/дл, 4,6±0,1, 4,0±0,1, 4,7±0,1, 5,8±0,3 мг/дл (pGLM = 0,000) у мужчин и 4,7±0,3мг/дл, 4,7±0,1, 4,1±0,1, 4,9±0,1, 5,9±0,2мг/дл у женщин (pGLM = 0,000). После проведения теста толерантности к глюкозе уровень глюкозы сыворотки в случае генотипов  $\epsilon_2/\epsilon_4$ ,  $\epsilon_2/\epsilon_3$ ,  $\epsilon_3/\epsilon_3$ ,  $\epsilon_3/\epsilon_4$  и  $\epsilon_4/\epsilon_4$  составил 6,0±0,6, 6,1±0,3, 5,2±0,2, 6,4±0,2, 8,4±0,5 мг/дл (pGLM = 0,000) у мужчин и 6,2±0,6, 6,1±0,2, 5,5±0,1, 6,7±0,1, 8,6±0,5 мг/дл (pGLM = 0,000) у женщин.

Выводы: популяция коренных жителей Горной Шории характеризуется высокой частотой распространения аллеля  $\epsilon_4$ , особенно у женщин. Генотип  $\epsilon_4/\epsilon_4$  ассоциирован с высоким уровнем глюкозы сыворотки.

*Ключевые слова:* ген апополипротеина E, полиморфизм, глюкоза, популяция, Горная Шория

Полиморфизм гена апополипротеина E (*APOE*) вносит значительный вклад в развитие сердечно-сосудистых и нейродегенеративных заболеваний. На сегодняшний день он является одним из наиболее изучаемых генетических маркеров нарушения липидного обмена в мире.

Аполипопротеин E входит в состав ремнантов хиломикрон, ЛОНП и ЛВП с высокой молекулярной массой. Ген, кодирующий этот липопротеин, имеет полиморфизм с тремя аллелями  $\epsilon_2$ ,  $\epsilon_3$ ,  $\epsilon_4$ , которые образуют шесть возможных генотипов:  $\epsilon_2/\epsilon_2$ ,  $\epsilon_2/\epsilon_4$ ,  $\epsilon_2/\epsilon_3$ ,  $\epsilon_3/\epsilon_3$ ,  $\epsilon_3/\epsilon_4$ ,  $\epsilon_4/\epsilon_4$ . По данным различных исследований в человеческой популяции наиболее распространенным является аллель  $\epsilon_3$ . Его частота составляет от 0,67 до 0,83 в различных популяциях [1, 2, 3]. Частота аллеля  $\epsilon_4$  также подвержена значительным колебаниям: от 0,06 в популяции Северного Китая до 0,31 в популяциях корен-

ных жителей Сибири, Северной Америки, Африки. Аллель  $\epsilon_2$  встречается с частотой от 0,02 в популяции Японии до 0,13 в популяции Франции.

Отдельные исследования свидетельствуют, что генотипы, содержащие  $\epsilon_2$  аллель, связаны с более низкими уровнями общего холестерина сыворотки (ОХС) и липопротеидов низкой плотности (ЛНП) и более высоким уровнем триглицеридов (ТГ), чем генотип  $\epsilon_3/\epsilon_3$ . В то время как генотипы, содержащие  $\epsilon_4$  аллель, имеют повышенный уровень ОХС и ЛНП. Полиморфизм гена *APOE* определяет от 5 до 15 % нарушений липидного профиля [4]. В некоторых исследованиях было отмечено влияние полиморфизма гена *APOE* на более высокий риск развития сердечно-сосудистых заболеваний при наличии у обследуемых лиц сахарного диабета [5, 6]. По-видимому, гипергликемия приводит к

гликозилированию апопротеина Е, что нарушает его функцию, а аллель  $\epsilon 4$ , изменяя аминокислотную последовательность белка, усиливает нарушение взаимодействия апопротеина Е с рецепторами.

В нашей работе представлены результаты исследования полиморфизма гена *APOE* в популяции коренных жителей Горной Шории (Кемеровская область). Проводился анализ полиморфизма кодирующей части гена *APOE* (112 и 158 С/Т).

#### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования выполнены на репрезентативной выборке из 170 человек коренных жителей Горной Шории (Кемеровская область) – шорцах. Материал собран при проведении одномоментного обследования неорганизованной сельской популяции Горной Шории в местах компактного проживания коренного населения. Возрастной диапазон составил 21–72 года.

ДНК выделяли из 10 мл периферической крови по стандартной методике Манниатис и др., 1984 [7].

Генотипирование гена *APOE* проводили с определением аллелей  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$ ,  $\epsilon 4$ . Для анализа была использована оригинальная методика генотипирования, основанная на подходе, предложенном Nixon et al., 1990 [8]. Геномную ДНК амплифицировали с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в стандартной реакционной смеси и далее гидролизовали рестриктазой *AspLE I* с сайтом распознавания GCGC. Визуализацию продуктов рестрикции проводили методом гель-электрофореза в 10 % полиакриламидном геле с последующей окраской бромистым этидием и тестировали с применением системы компьютерной видеосъемки.

Кровь для исследования брали минимум через 12 ч после последнего приема пищи из локтевой вены.

Уровень глюкозы капиллярной крови определяли экспресс-методом (натошак и через 120 мин после приема 75 г глюкозы) при помощи глюкометра фирмы “Берингер-Мангейм”, используя тест-полоски этой же фирмы. С-пептид и иммунореактивный инсулин определены иммуноферментным методом.

Анализ ассоциации показателей углеводного обмена с изучаемым полиморфизмом проводили с использованием пакета прикладных статистических программ.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В популяции Горной Шории обследовано 170 человек (33 мужчины и 137 женщин), средний возраст составил  $44,9 \pm 14$  лет для мужчин и  $44,5 \pm 13,7$  года для женщин, в возрастном диапа-

зоне 21–72 года. Широкий возрастной диапазон связан с малочисленностью данной этнической группы. Частота генотипов  $\epsilon 2/\epsilon 4$ ,  $\epsilon 2/\epsilon 3$ ,  $\epsilon 3/\epsilon 3$ ,  $\epsilon 3/\epsilon 4$ ,  $\epsilon 4/\epsilon 4$  в популяции составила 1,8, 12,4, 51,8, 31,2, 2,9 % соответственно. Частота аллелей  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$ ,  $\epsilon 4$  составила у мужчин 6,5, 80,4, 13,1 %, у женщин – 7,6, 72,6, 19,8 % соответственно. Частота генотипов находится в равновесии Харди–Вайнберга.

Результаты анализа межпопуляционных различий по частоте генотипов показали, что популяция Горной Шории с высоким уровнем достоверности отличалась большей распространенностью генотипов, содержащих аллель  $\epsilon 4$ , от европеоидной популяции г. Новосибирска ( $p < 0,05$ ) [9].

В популяции Горной Шории максимальные уровни глюкозы крови натощак наблюдаются при генотипе  $\epsilon 4/\epsilon 4$  как у мужчин, так и у женщин (табл. 1). Также высокие уровни глюкозы крови выявлены при генотипах  $\epsilon 2/\epsilon 4$ ,  $\epsilon 2/\epsilon 3$  и  $\epsilon 3/\epsilon 4$  по сравнению с генотипом  $\epsilon 3/\epsilon 3$ . Минимальные уровни глюкозы крови определяются при генотипе  $\epsilon 3/\epsilon 3$ . В возрастных группах 18–44 лет и 45–72 лет выявлено статистически значимая ассоциация генотипов полиморфизма кодирующей части гена *APOE* с уровнем глюкозы крови как у мужчин, так и у женщин ( $p = 0,000$ ).

При объединении возрастных групп в популяции шорцев выявлено статистически значимая ассоциация возраста, ИМТ и генотипов полиморфизма кодирующей части гена *APOE* с уровнем глюкозы крови как у мужчин, так и у женщин ( $p < 0,05$ ).

В популяции Горной Шории максимальные уровни глюкозы крови после проведения теста толерантности к глюкозе (ТТГ) наблюдаются при генотипе  $\epsilon 4/\epsilon 4$  как у мужчин, так и у женщин (табл. 2). Минимальные уровни глюкозы крови определяются при генотипе  $\epsilon 3/\epsilon 3$ . В возрастной группе 45–72 лет выявлено независимое влияние ИМТ на уровень глюкозы крови ( $p = 0,002$ ). В обеих возрастных группах не выявлено влияния возраста и пола на уровень глюкозы крови после нагрузки. В возрастных группах 18–44 и 45–72 лет выявлено статистически значимое влияние генотипов полиморфизма кодирующей части гена *APOE* на уровень глюкозы крови как у мужчин, так и у женщин ( $p = 0,000$ ).

При объединении возрастных групп в популяции шорцев минимальные уровни глюкозы крови после нагрузки определены при генотипе  $\epsilon 3/\epsilon 3$  у мужчин и женщин. Наиболее высокие уровни глюкозы крови выявлены при генотипе  $\epsilon 4/\epsilon 4$ . В популяции шорцев различия между генотипами по полиморфизму в кодирующей области гена по уровню глюкозы крови после нагрузки были статистически значимы.

Таблица 1

**Уровни глюкозы крови натощак (ммоль/л) для генотипов полиморфизма кодирующей части гена *APOE* в популяции Горной Шории**

Генотип	$x(S_x)$		$x(S_x)$		$x(S_x)$	
	Возраст					
	18–44		45–72		18–72	
	Пол					
	м	ж	м	ж	м	ж
$\epsilon 2/\epsilon 4$	– $n = 0$	4,5 (0,4) $n = 1$	4,8 (0,4) $n = 1$	5,0 (0,4) $n = 1$	4,6 (0,3) $n = 1$	4,7 (0,3) $n = 2$
$\epsilon 2/\epsilon 3$	4,2 (0,2) $n = 1$	4,2 (0,2) $n = 6$	4,9 (0,2) $n = 3$	5,1 (0,2) $n = 11$	4,6 (0,1) $n = 4$	4,7 (0,1) $n = 17$
$\epsilon 3/\epsilon 3$	3,9 (0,1) $n = 11$	3,9 (0,1) $n = 36$	4,1 (0,2) $n = 9$	4,3 (0,1) $n = 32$	4,0 (0,1) $n = 20$	4,1 (0,1) $n = 68$
$\epsilon 3/\epsilon 4$	4,6 (0,1) $n = 3$	4,7 (0,1) $n = 21$	4,8 (0,2) $n = 4$	5,0 (0,1) $n = 25$	4,7 (0,1) $n = 7$	4,9 (0,1) $n = 46$
$\epsilon 4/\epsilon 4$	– $n = 0$	6,1 (0,4) $n = 1$	5,8 (0,3) $n = 1$	6,0 (0,3) $n = 3$	5,8 (0,3) $n = 1$	5,9 (0,2) $n = 4$
Возраст (p)	0,363		0,434		0,000*	
ИМТ (p)	0,568		0,008*		0,012*	
Пол (p)	0,883		0,202		0,231	
Генотип (p)	0,000*		0,000*		0,000*	

Таблица 2

**Уровни глюкозы крови после нагрузочного теста (ммоль/л) для разных генотипов полиморфизма кодирующей части гена *APOE* в популяции Горной Шории**

Генотип	$x(S_x)$		$x(S_x)$		$x(S_x)$	
	Возраст					
	18–44		45–72		18–72	
	Пол					
	м	ж	м	ж	м	ж
$\epsilon 2/\epsilon 4$	– $n = 0$	5,6 (0,8) $n = 1$	6,5 (0,8) $n = 1$	7,0 (0,8) $n = 1$	6,0 (0,6) $n = 1$	6,2 (0,6) $n = 2$
$\epsilon 2/\epsilon 3$	5,6 (0,4) $n = 1$	5,6 (0,3) $n = 6$	6,5 (0,4) $n = 3$	6,9 (0,3) $n = 11$	6,1 (0,3) $n = 4$	6,4 (0,2) $n = 17$
$\epsilon 3/\epsilon 3$	5,1 (0,2) $n = 11$	5,1 (0,1) $n = 36$	5,4 (0,3) $n = 9$	5,8 (0,2) $n = 32$	5,2 (0,2) $n = 20$	5,5 (0,1) $n = 68$
$\epsilon 3/\epsilon 4$	6,4 (0,3) $n = 3$	6,3 (0,2) $n = 21$	6,5 (0,3) $n = 4$	7,0 (0,2) $n = 25$	6,4 (0,2) $n = 7$	6,7 (0,1) $n = 46$
$\epsilon 4/\epsilon 4$	– $n = 0$	9,0 (0,8) $n = 1$	8,2 (0,6) $n = 1$	8,7 (0,6) $n = 3$	8,4 (0,5) $n = 1$	8,6 (0,5) $n = 4$
Возраст (p)	0,377		0,481		0,004*	
ИМТ (p)	0,894		0,002*		0,010*	
Пол (p)	0,937		0,103		0,186	
Генотип (p)	0,000*		0,000*		0,000*	

В популяции Горной Шории также была определена ассоциация средних уровней иммунореактивного инсулина (ИРИ) и С-пептида с полиморфизмом кодирующей части гена *APOE* на подвыборке из 18 человек. ИРИ, С-пептид и генотипы полиморфизма кодирующей части гена *APOE* были определены для 2 мужчин и 16 женщин в возрасте 18–72 лет.

Для полиморфизма кодирующей части гена *APOE* не было выявлено статистически значимой ассоциации с уровнями ИРИ и С-пептида (табл. 3).

В ранее проведенных нами исследованиях была показана ассоциация полиморфизма –491A/T промотора гена *APOE* в популяции шорцев со средними уровнями ИРИ ( $p = 0,041$ )

Таблица 3

Уровни ИРИ (мкед/мл) и С-пептида (нмоль/л) для разных генотипов полиморфизма кодирующей части гена *APOE* в популяции Горной Шории

Генотип	ИРИ		С-пептид	
	X(S <sub>x</sub> )	X(S <sub>x</sub> )	X(S <sub>x</sub> )	X(S <sub>x</sub> )
	Пол			
	м	ж	м	Ж
ε2/ε4	—	—	—	—
ε2/ε3	23,2 (8,2) n = 1	5,4 (6,5) n = 2	0,9 (0,3) n = 1	0,4 (0,2) n = 2
ε3/ε3	29,7 (8,0) n = 1	11,9 (3,9) n = 8	1,1 (0,3) n = 1	0,5 (0,1) n = 8
ε3/ε4	—	13,7 (4,7) n = 5	—	0,6 (0,2) n = 5
ε4/ε4	—	13,3 (11,2) n = 1	—	0,7 (0,4) n = 1
Возраст (р)	0,806		0,600	
ИМТ (р)	0,826		0,966	
Пол (р)	0,059		0,058	
Генотип (р)	0,762		0,795	

и С-пептида ( $p = 0,05$ ) [10]. Учитывая этот факт, актуально выполнить дополнительное исследование полиморфизма гена *APOE* на большем количестве обследованных, с определением ИРИ и С-пептида, для уточнения ассоциативных связей полиморфизма гена *APOE* и углеводного обмена.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В популяции шорцев, как и в других популяциях мира, наиболее часто встречается аллель ε3. Частота аллеля ε2 в популяции Горной Шории статистически значимо не отличается от европеоидной популяции Сибири и находится в пределах средних значений для распространенности данного аллеля в других популяциях [1]. По частоте распределения аллелей популяция шорцев занимает близкое положение к популяциям финно-угорских народностей Евразии, коренных жителей Африки и Новой Гвинеи, аборигенам Нового Света и Австралии.

В популяции Горной Шории была изучена ассоциация полиморфизма гена *APOE* с некоторыми нелипидными факторами риска сердечно-сосудистых заболеваний, в частности, с параметрами углеводного обмена. В популяции коренных жителей Горной Шории выявлена статистически значимая ассоциация полиморфизма кодирующей части гена *APOE* с уровнем глюкозы крови

как натощак, так и после проведения теста толерантности к глюкозе у мужчин и женщин. В популяции шорцев влияние полиморфизма промотора гена *APOE* на уровень С-пептида и иммунореактивного инсулина требует дальнейшего изучения на большей по объему выборке.

Это исследование демонстрирует вклад полиморфизма гена апополипротеина Е как фактора, влияющего на развитие гипергликемии в изученной популяции. Таким образом, литературные и полученные нами данные о взаимосвязи полиморфизма гена *APOE* с некоторыми факторами риска сердечно-сосудистых заболеваний подтверждают перспективность исследования генов-кандидатов хронических неинфекционных заболеваний в Сибири.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Utermann G. Apolipoprotein polymorphism and multifactorial hyperlipidaemia // *J Inher Metab Dis.* — 1988. — V. 1. P. 74-86.
2. Mustafina O.E., Shagisultanova E.I., Tuktarova I.A., Khusnutdinova E.K. Polymorphism of the apolipoprotein E gene and the risk of myocardial infarction // *Mol Biol (Mosk).* — 2002. — V. 36(6). P. 978-984.
3. Davignon J., Gregg R.E., Sing C.F. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis // *Arteriosclerosis.* — 1988. — V. 8. P. 1-21.
4. Talmud P.J., Humphries S.E. Gene: environment interaction in lipid metabolism and effect on coronary heart disease risk // *Curr. Opin. Lipidol.* — 2002. — V. 13(2). — P. 149-54.
5. Haffner S.M., Stern M.P., Miettinen H., Robbins D., Howard B.V. Apolipoprotein E Polymorphism and LDL Size in a Biethnic Population // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* — 1996. — V. 16(9). — P. 1184-1188.
6. Привалов Д.В., Чумакова О.С., Зотова И.В. и др. Полиморфизм генов липидтранспортной системы крови у пациентов с нестабильной стенокардией и сахарным диабетом // *Вестник РАМН.* — 2003. — V. 1. — P. 40-43.
7. Манниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984.
8. Nixon J.E., Vernier D.T. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with *HhaI* // *J Lipid Research.* — 1990. — V. 31. P. 545-548.
9. Воевода М.И., Степанов В.А., Ромашенко А.Г., Максимов В.Н. Этнологические особенности подверженности атеросклерозу в этнических группах Сибири (на примере гена апополипротеина Е) // *Бюл. СО РАМН.* — 2006. — V. 2 (120). — P. 63-72.
10. Шахтшнейдер Е.В. Связь полиморфизма гена апополипротеина Е с факторами риска хронических неинфекционных заболеваний в популяциях г. Новосибирска и коренных жителей Горной Шории: Автореф. дис. к-та мед. наук. Новосибирск, 2004.

**Objective:** we investigated apolipoprotein E gene polymorphism and its influence on a carbohydrate metabolism in native population of Mountain Shoria (West Siberia).

**Methods:** The study included 40 men and 80 women aged 25-64. The apolipoprotein E polymorphism was analyzed by original method using Hixson's approach. The serum glucose levels were determined by standard enzymatic assays.

**Results:** The frequencies of  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$ ,  $\epsilon 4$  alleles in men were 6.5 %, 80.4 %, 13.1 % and in women – 7.6 %, 72.6 %, 19.8 % respectively. The frequencies of genotypes  $\epsilon 2/\epsilon 4$ ,  $\epsilon 2/\epsilon 3$ ,  $\epsilon 3/\epsilon 3$ ,  $\epsilon 3/\epsilon 4$ ,  $\epsilon 4/\epsilon 4$  in men and women together were 1.8 %, 12.4 %, 51.8 %, 31.2 % and 2.9 %. Mean fasting serum glucose levels in case of genotypes  $\epsilon 2/\epsilon 4$ ,  $\epsilon 2/\epsilon 3$ ,  $\epsilon 3/\epsilon 3$ ,  $\epsilon 3/\epsilon 4$  and  $\epsilon 4/\epsilon 4$  were  $4.6 \pm 0.3$  mg/dl,  $4.6 \pm 0.1$  mg/dl,  $4.0 \pm 0.1$  mg/dl,  $4.7 \pm 0.1$  mg/dl,  $5.8 \pm 0.3$  mg/dl (pGLM=0,000) in man and  $4.7 \pm 0.3$  mg/dl,  $4.7 \pm 0.1$  mg/dl,  $4.1 \pm 0.1$  mg/dl,  $4.9 \pm 0.1$  mg/dl,  $5.9 \pm 0.2$  mg/dl in women (pGLM=0,000). After glucose tolerance test mean serum glucose levels in case of genotypes  $\epsilon 2/\epsilon 4$ ,  $\epsilon 2/\epsilon 3$ ,  $\epsilon 3/\epsilon 3$ ,  $\epsilon 3/\epsilon 4$  and  $\epsilon 4/\epsilon 4$  were  $6.0 \pm 0.6$  mg/dl,  $6.1 \pm 0.3$  mg/dl,  $5.2 \pm 0.2$  mg/dl,  $6.4 \pm 0.2$  mg/dl,  $8.4 \pm 0.5$  mg/dl (pGLM=0,000) in man and  $6.2 \pm 0.6$  mg/dl,  $6.1 \pm 0.2$  mg/dl,  $5.5 \pm 0.1$  mg/dl,  $6.7 \pm 0.1$  mg/dl,  $8.6 \pm 0.5$  mg/dl (pGLM=0,000) in women .

**Conclusions:** The native population of Mountain Shoria is characterized by relatively high frequencies of  $\epsilon 4$  alleles. The allele  $\epsilon 4$  prevails in women. The genotype  $\epsilon 4/\epsilon 4$  has been associated with higher serum glucose level.

*Key words:* apolipoprotein E gene, polymorphism, glucose levels, population, Mountain Shoria

---