

М.И. Воевода, В.А. Степанов, А.Г. Ромашенко, В.Н. Максимов

ЭТНОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПОДВЕРЖЕННОСТИ АТЕРОСКЛЕРОЗУ В ЭТНИЧЕСКИХ ГРУППАХ СИБИРИ (НА ПРИМЕРЕ ГЕНА АПОЛИПОПРОТЕИНА E)

ГУ НИИ терапии СО РАМН, Новосибирск
ГУ НИИ медицинской генетики СО РАМН, Томск
Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

Анализ полиморфизма генов играет важную роль в оценке предрасположенности к мультифакториальным заболеваниям на популяционном и индивидуальном уровне. В настоящей работе было проведено определение частот аллельных вариантов гена апополипротеина E и соответствующих генотипов у представителей различных этнических групп Сибири: коренных жителей Чукотского автономного округа, Северного Алтая, Горной Шории, Ханты-Мансийского автономного округа, Хакасии и в европейской популяции жителей г. Новосибирска. Для изученных популяций была выявлена связь полиморфизма гена апополипротеина E с некоторыми хроническими неинфекционными заболеваниями и их факторами риска.

Ключевые слова: апополипротеин E, промотор, популяции, хронические неинфекционные заболевания, геронты, ишемическая болезнь сердца, инсульт, болезнь Альцгеймера, желчно-каменная болезнь

Хронические неинфекционные заболевания человека (ХНИЗ), такие, как атеросклероз, гипертоническая болезнь, сахарный диабет, широко распространены в различных популяциях и являются ведущими причинами смертности населения. Повышение эффективности ранней профилактики ХНИЗ связывают с выявлением генетических маркеров предрасположенности к данным заболеваниям и изучением особенностей их распространенности в различных популяциях.

Ген апополипротеина E (*APOE*) активно изучается как один из наиболее известных генов-кандидатов, полиморфизм которого оказывает выраженное влияние на уровень липидов крови и предрасположенность к ряду сердечно-сосудистых и нейродегенеративных заболеваний. В различных популяциях мира в большинстве исследований при наличии в генотипе индивидов аллеля E4 отмечаются проатерогенные изменения спектра липидов крови [11, 13, 18, 22]. Аллель E4 связан с повышением уровня ОХС, ЛПНП и снижением уровня ЛПВП [8, 21, 31]. По результатам мета-анализа имеющихся в мировой литературе данных показана связь между наличием аллеля E4 и развитием коронарной патологии как у мужчин, так и у женщин [9, 10]. У больных с острым инфарктом миокарда отмечается повышение частоты аллеля E4 и снижение частоты аллеля E2. У пациентов с сахарным диабетом риск развития осложнений со стороны сердечно-сосудистой

системы выше в присутствии аллеля E4 [4, 5, 12]. С аллелем E4 связывают спорадическое возникновение болезни Альцгеймера [15, 17, 27, 29]. При сочетании повышения систолического АД более 160 мм рт. ст. и наличия аллеля E4 выявлено повышение риска развития нарушения когнитивных функций [26].

Полученные на сегодня результаты свидетельствуют о специфичности связи полиморфизма в кодирующей части гена *APOE* с факторами риска ХНИЗ в разных популяциях и этнических группах, что обуславливает актуальность изучения этого вопроса для конкретных этнических групп, проживающих в специфических социально-экономических и климато-географических условиях, в том числе для различных этнических групп Сибири.

В последнее время было обнаружено, что с предрасположенностью к ХНИЗ, помимо полиморфизма в кодирующей области гена *APOE*, также может быть связана вариабельность структуры его промотора, в частности полиморфизма промоторной зоны -491A/T. По результатам первых исследований он связан с развитием инфаркта миокарда и нейродегенеративными заболеваниями [7, 24]. Информация об уровне данного полиморфизма и особенностях его связи с факторами риска ХНИЗ в различных этнических группах крайне ограничена, что обуславливает особую актуальность данной проблемы.

Материалы и методы

Банк ДНК популяции жителей г. Новосибирска в возрасте 25-64 года был сформирован в 1994-1995 гг. ГУ НИИ терапии СО РАМН в ходе выполнения третьего одномоментного скринирующего обследования населения в рамках международной кооперативной программы по изучению тенденций заболеваемости и смертности от сердечно-сосудистых заболеваний и определяющих их факторов (программа ВОЗ «MONICA»). Всего было обследовано 800 мужчин и 800 женщин. Генотипирование по полиморфизму гена *APOE* выполнено у 603 человек: 423 мужчины и 176 женщин. Средний возраст мужчин составил $45,0 \pm 9,4$ лет, женщин — $46,2 \pm 11,6$ лет. Группа пожилых и долгожителей, включенная в исследование, собиралась в ходе домашних визитов и среди пациентов домов престарелых г. Новосибирска. Всего обследовано 97 человек: 29 мужчин и 68 женщин. Возраст 83-105 лет. Средний возраст $91,89 \pm 0,32$ лет. Из них долгожителей (в возрасте 90 лет и старше) — 82 человека (17 мужчин и 65 женщин). Включенная в исследование выборка жителей Октябрьского района города Новосибирска, перенесших острый инфаркт миокарда по данным популяционного регистра инфаркта миокарда (программы ВОЗ «Регистр острого инфаркта миокарда» и «MONICA»), представлена в количестве 93 человек: 65 мужчин и 28 женщин. Средний возраст развития инфаркта миокарда у мужчин 50,9 лет (95% доверительный интервал 47,3-54,5 года). Средний возраст развития инфаркта миокарда у женщин 57,3 года (95% доверительный интервал 53,0-61,7 года). Группа обследованных с болезнью Альцгеймера составила 226 человек, обследование проводилось среди пациентов психиатрических больниц г. Новосибирска. Группа обследованных с инсультом была выявлена методом регистра мозгового инсульта и составила 253 человека, средний возраст $64,5 \pm 10,6$. Группа обследованных с желчно-каменной болезнью (ЖКБ) составила 97 человек, средний возраст $53,5 \pm 11,5$ лет, обследование проводилось у пациентов г. Новосибирска, госпитализированных в Дорожную клиническую больницу с диагнозом ЖКБ.

Популяция коренных жителей Северного Алтая — алтайцев, представлена выборкой численностью 57 человек.

В Горной Шории проведено одномоментное исследование неорганизованной сельской популяции экспедиционным методом с 1998 по 2001 год. Работа выполнена в местах компактного проживания шорцев — поселках Усть-Кабырза, Большой Ортон, Ильинка, Трехречье, Казасс, Учас, Чувашка, Базас, Чуазасс. Сплошным ме-

тодом на основании поименных списков в экспедиционных условиях обследовано 550 шорцев, проживающих в указанных поселках. Данная работа выполнена на подвыборке из 170 человек, 33 мужчины и 137 женщин. Возрастной диапазон составил 18-72 г. Более широкий возрастной диапазон обусловлен малочисленностью этнической группы в целом. Средний возраст мужчин составил $44,9 \pm 14,1$ лет, женщин — $44,5 \pm 13,7$ лет.

Выборка коренных жителей Хакасии составила 141 человек, средний возраст $40,3 \pm 0,8$ года. Выборка больных ИБС хакасской национальности составила 54 человека, средний возраст $57,1 \pm 0,6$, в исследование включены пациенты Хакасской республиканской больницы, перенесшие инфаркт миокарда.

Коренные жители Ханты-Мансийского автономного округа — ханты и манси, численность выборки 45 человек, средний возраст 34,1 лет.

Коренные жители Чукотского автономного округа — чукчи и эскимосы, выборка составила 135 чел, средний возраст $41,4 \pm 12,8$ лет.

Учитывая отсутствие достоверных различий в частотах аллелей *APOE*, этнические группы чукчи и эскимосы, а также ханты и манси рассматривались вместе.

Обследование включало измерение артериального давления, антропометрию, исследование липидного состава крови.

Выделение ДНК из образцов крови и тканей осуществляли методом фенол-хлороформной экстракции по модифицированной методике Смита с соавторами (1990) [6].

APOE ген размером 3,7 кб, включает четыре экзона [25, 19] и расположен на хромосоме 19. В данной работе ген *APOE* тестировался на наличие полиморфизма в позиции 3937С/Т и 4075С/Т. Эта замена азотистых оснований в ДНК определяет изменение в структуре аминокислотной последовательности белка и приводит к синтезу белка с аминокислотами цистеин или аргинин в положении 112 и 158. При этом формируются наиболее распространенные аллельные варианты: E2 (Cys112, Cys158); E3 (Cys112, Arg158) и E4 (Arg112, Arg158) и формируемые ими генотипы: три гомозиготных (E4/E4, E3/E3, E2/E2) и три гетерозиготных (E3/E4, E2/E4, E2/E3). Для анализа была использована оригинальная методика генотипирования, основанная на подходе, предложенном J.E. Nixson и D.T. Vernier в 1990 году [23]. Геномную ДНК (0,5 мкг) амплифицировали с помощью ПЦР в 25 мкл реакционной смеси содержащей: 75мМ Трис-НCl pH 9,0, сульфат аммония 20 мМ, 0,01 % Tween-20, по 0,8 мкМ прямого и обратного праймера, 0,2 мМ каждого из четырех дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, 3,5 мМ $MgCl_2$,

10% глицерин, DMSO 100 % и 2,5 е.а. Таq-полимеразы. Структура прямого и обратного праймеров: 5'-acaga-attcg-ccccg-gcctg-gtaca-c-3' и 5'-taagc-ttggc-acggc-tgtcc-aagga-3'. Гидролиз проводили рестриктазой AspLE I с сайтом распознавания GCGC. Специфический набор таких сайтов в случае каждого аллеля APOE приводит к образованию специфического набора фрагментов ДНК после гидролиза. Визуализацию ПЦР-продукта проводили методом гель-электрофореза в 10% полиакриламидном геле с последующей окраской бромистым этидием и тестировали с применением системы компьютерной видеосъемки.

Определение полиморфизма промотора гена APOE проводилось методом аллельспецифической ПЦР структура праймеров: общий 5'-tgtcc-tttcc-tgtgc-ctgga-tga-3', дикий 5'-tgttg-gccag-gctgg-tctca-ta-3', мутантный 5'-tgttg-gccag-gctgg-tctca-tt-3'. ПЦР смесь объемом 12,5мкл включала: буфер 2,5мкл (Трис-НСI (рН 9,0), (NH₄)₂ SO₄, Tween-20 10%), каждого праймера по 1,5мкл, по 0,2 мкл раствора каждого из четырех dNTP 10мМ, 25мМ MgCl₂ 1,5мкл, 2,5 единицы Таq-полимеразы, 0,3мкг ДНК.

Анализ связи изучаемых параметров с полиморфизмами проводили с помощью процедуры общего линейного анализа пакета статистических программ SPSS 10.0

Результаты

Результаты распределения частот аллелей и генотипов APOE в различных этнических группах Сибири представлены в таблице 1.

Наиболее распространенным во всех изучен-

ных популяциях, как и в большинстве популяций мира, является аллель E3. В результате проведенного исследования установлено, что распространенность аллелей E2 и E4 в популяциях Сибири имеет достоверные различия.

У коренных жителей Горной Шории, хакасов и финно-угров Западной Сибири отмечается повышение частоты аллеля E4 в сравнении с наблюдаемыми значениями в ряде западноевропейских популяций. Популяция Северного Алтая характеризуется снижением частоты аллеля E4 по сравнению с популяциями шорцев, хакасов, ханты и манси. Из полученных результатов видно, что шорцы значительно различаются по распределению редких аллелей от географически близких к ним северных алтайцев, что подтверждает ранее высказанное предположение о генетической близости шорцев к финно-угорским народностям. Популяция коренных жителей Хакасии достоверно не отличается по частоте редких аллелей от популяций как финно-угорских народностей, так и популяций европейского типа и занимает промежуточное положение.

Частоты генотипов при объединении полов соответствуют теоретически ожидаемым и находятся в равновесии Харди-Вайнберга.

В популяции г. Новосибирска, на 97% представленной европеоидным населением, частота аллелей E2 и E4 близка к частоте, наблюдаемой в странах Центральной и Восточной Европы. Также близкий к европейскому и восточноазиатскому уровню полиморфизма E4 и E2 обнаружен у коренных жителей Северного Алтая. Это мо-

Таблица 1

Частоты аллелей и генотипов гена аполипопротеина E

Популяции	N, чел.	Частота генотипа, % (Sp)						Частота аллелей, % (Sp)			χ^2 -W (P)
		E2/E2	E2/E3	E2/E4	E3/E3	E3/E4	E4/E4	E2	E3	E4	
Алтайцы	57	—	0,12 (0,04) n=7	—	0,74 (0,06) n=42	0,14 (0,05) n=8	—	0,07 (0,02)	0,87 (0,03)	0,06 (0,02)	0,109 (1,00)
Русские	603	—	0,12 (0,01) n=70	0,02 (0,01) n=12	0,67 (0,02) n=401	0,18 (0,02) n=109	0,02 (0,01) n=11	0,07 (0,01)	0,81 (0,01)	0,12 (0,01)	4,793 (0,22)
Ханты, Манси	36	—	0,06 (0,04) n=2	—	0,64 (0,08) n=23	0,22 (0,07) n=8	0,08 (0,05) n=3	0,03 (0,02)	0,78 (0,05)	0,19 (0,06)	3,352 (0,15)
Хакасы	141	—	0,10 (0,03) n=14	0,04 (0,02) n=5	0,62 (0,04) n=88	0,23 (0,04) n=32	0,01 (0,01) n=2	0,07 (0,02)	0,79 (0,02)	0,15 (0,02)	2,843 (0,40)
Чукчи	135	—	—	—	0,70 (0,04) n=94	0,26 (0,04) n=35	0,05 (0,02) n=6	—	0,83 (0,02)	0,17 (0,02)	1,31 (0,37)
Шорцы	170	—	0,12 (0,03) n=21	0,02 (0,01) n=3	0,52 (0,04) n=88	0,31 (0,04) n=53	0,03 (0,01) n=5	0,07 (0,01)	0,74 (0,02)	0,19 (0,02)	2,607 (0,43)

Примечание: здесь и далее в аналогичных таблицах P — частота, Sp — ошибка частоты, n — число индивидов, χ^2 — хи-квадрат, рхв — вероятность соответствия наблюдаемого распределения частот генотипов равновесию Харди-Вайнберга.

жет быть обусловлено характером миграционных процессов населения первичных очагов земледелия Северного и Центрального Китая.

По данным научных исследований, в масштабе планеты можно выделить U-образный широтный географический градиент частоты аллеля E4 с максимальными значениями на экваторе и в циркумполярных областях Северного полушария. Минимальные значения частоты аллеля E4 отмечаются в популяциях субтропического пояса от Японии до Средиземноморского побережья в Евразии и у индейцев майя в Новом Свете. Существенные различия отмечаются и внутри расовых групп, например между жителями севера и юга Европы. Частота аллеля E2 в различных регионах также подвержена значительным колебаниям. Он мало распространен в Северной Азии, Австралии и Новом Свете.

Возможно, это обусловлено механизмами приспособления популяции человека к условиям внешней среды и связанными с ней особенностями образа жизни на ранних стадиях ее развития. Следует подчеркнуть то обстоятельство, что наименьшие частоты аллеля E4 в популяциях географически совпадают с первичными центрами земледелия на планете [1, 3]. Согласно Harlan и Shaw (1972), выделяются три таких независимых очага: в Юго-Западной Азии (7-8 тысячелетия до н.э., культивирование пшеницы и ячменя), на территории Северного и Центрального Китая (5-4 тысячелетия до н.э., культивирование проса и, возможно, риса) и в Мезоамерике (7-6 тысячелетия до н.э., культивирование кукурузы). И наоборот, самые высокие частоты аллеля E4 отмечаются в этнических группах, сохранявших до последнего времени (последнее тысячелетие и даже последние столетия) уклад жизни охотников-соби-

рателей. Этот уклад предшествовал появлению культур сельскохозяйственного типа и являлся единственной формой хозяйственной деятельности человека во всех популяциях планеты еще примерно 10-12 тысяч лет назад. Наблюдаемое распределение варианта E4 в этнических группах современного человечества, по-видимому, до некоторой степени обусловлено особенностями его существования и типом хозяйственной деятельности в неолите. В предшествовавшем же палеолитическом периоде наиболее вероятно, что в популяции человека уровень полиморфизма APOE с относительно высокой частотой аллеля E4 был более однороден. В последствии, вероятно, произошло снижение частоты аллеля E4 в популяциях первичных центров развития сельскохозяйственного земледелия [1, 3].

При оценке возрастной динамики частот генотипов в младших возрастных группах, которые еще не дожили до фатальных проявлений основной части сердечно-сосудистых заболеваний, полученная частота аллелей и генотипов полиморфизма гена APOE реально отражает частоту, передающуюся по наследству. В мужской популяции г. Новосибирска в возрастном интервале 25-64 лет статистически значимой возрастной динамики частот генотипов гена APOE выявлено не было (Таблица 2). При объединении в возрастные группы 25-44 г. и 45-64 г. в популяции мужчин г. Новосибирска выявлено повышение частоты аллелей E2 в старшей возрастной группе с 6,1 до 8,4% и снижение частоты аллеля E4 с 13,1 до 10,2%. Повышение частоты аллеля E2 в старших возрастных группах не противоречит результатам, полученным в исследованиях Giovanni 2001 г. и, по-видимому, обусловлено более низкими уровнями липидов крови и более поздним раз-

Таблица 2

Возрастная динамика частоты генотипов гена APOE в популяции г. Новосибирска

	Генотипы					
	E2/E2	E2/E4	E2/E3	E3/E3	E3/E4	E4/E4
Популяционная выборка						
Мужчины 25-34 г. n=57	-	0,05	0,14	0,65	0,14	0,02
Мужчины 35-44 г. n=156	-	0,01	0,08	0,68	0,20	0,03
Мужчины 45-54 г. n=137	-	0,03	0,11	0,71	0,14	0,01
Мужчины 55-64 г. n=73	-	0,03	0,18	0,63	0,12	0,04
Женщины 25-34 г. n=38	-	-	0,08	0,58	0,34	-
Женщины 35-44 г. n=38	-	-	0,16	0,71	0,13	-
Женщины 45-54 г. n=48	-	-	0,11	0,60	0,27	0,02
Женщины 55-64 г. n=52	-	-	0,14	0,67	0,19	-
Лица старческого возраста и долгожители						
Мужчины 84 г. и старше n=23	-	-	0,22	0,74	0,04	-
Мужчины 90 г. и старше n=13	-	-	0,23	0,69	0,08	-
Женщины 83 г. и старше n=53	-	-	0,17	0,68	0,15	-
Женщины 90 г. и старше n=15	-	-	0,13	0,73	0,13	-

витием сердечно-сосудистых заболеваний, что увеличивает продолжительность жизни носителей аллеля E2. Вероятнее всего, до 45-летнего возраста селектирующие факторы не оказывают существенного влияния на структуру генофонда рассмотренной популяции по данному полиморфизму. При сравнении частоты генотипа E3/E4 гена APOE в возрастных группах 25-64 г. в данной популяции с частотой этого генотипа у мужчин старше 83 лет оказалось, что она снизилась в 4 раза. Это, на наш взгляд, может объясняться неблагоприятным липидным профилем, часто имеющимся у носителей генотипа E3/E4 [20, 30] и, соответственно, атеросклерозом и его осложнениями, которые приводят к выбыванию его носителей из популяции в возрастном интервале от 65 до 83 лет. У женщин статистически значимой возрастной динамики частот генотипов гена APOE не выявлено.

Для сравнения, в популяции Горной Шории выявлена тенденция к росту частоты аллелей E2 и E4 у мужчин и женщин в возрастных группах 45-72 г. ($p > 0,05$). Эти особенности возрастного изменения частоты генотипов полиморфизма кодирующей части гена APOE, возможно, обусловлены эволюционными особенностями данной популяции и обеспечивают оптимальный адаптационный потенциал в условиях нерегулярного поступления пищевых продуктов и соответствующего колебания уровня физической активности.

На следующем этапе молекулярно-эпидемиологического анализа была изучена связь полиморфизма гена аполиipoproteина E с рядом распространенных патологий в обследованных выборках.

В популяции г. Новосибирска, коренных жителей Горной Шории, коренных жителей Чукотского автономного округа и коренных жителей Хакасии анализировали связь полиморфизма кодирующей части гена APOE с уровнями липидов крови: общего холестерина сыворотки (ОХС), холестерина липопротеидов высокой плотности (ХС-ЛПВП), холестерина липопротеинов низкой плотности (ХС-ЛПНП), триглицеридов (ТГ), (Таблица 3).

В популяции г. Новосибирска различия в средних уровнях ОХС были статистически достоверны ($p < 0,05$) при попарных сравнениях между генотипом E4/E4 и генотипами E2/E3, E3/E3, E3/E4. Максимальное значение среднего уровня ОХС выявлено для генотипа E4/E4, наличие данного генотипа определяет повышение среднего уровня ОХС на 25,8 мг/дл по сравнению с генотипом E3/E3. Минимальные значения среднего уровня ОХС определяются при генотипе E2/E3. Выявлены более низкие значения среднего уровня

ОХС при генотипе E3/E4 по сравнению с генотипами E3/E3 и E4/E4 как у мужчин, так и у женщин. В общей факторной модели в популяции г. Новосибирска обнаружено статистически значимое влияние возраста и ИМТ на ОХС ($p = 0,000$). При оценке уровня липидов крови у лиц старческого возраста и долгожителей в зависимости от генотипа гена APOE оказалось, что средний уровень общего холестерина у женщин-носительниц генотипа E2/E3 был статистически значимо ниже, чем у женщин-носительниц генотипа E3/E3 (161 и 180 мг/дл соответственно, $p < 0,000$). Кроме этого, как в общей группе этого контингента обследованных (без разделения по полу), так и в группе только женщин средний уровень ХС-ЛПВП у носителей генотипа E2/E3 был статистически значимо выше, чем у носителей двух других генотипов. По уровню триглицеридов статистически значимых различий между носителями разных генотипов не выявлено. Таким образом, в целом особенности липидного обмена были более благоприятными у женщин-носительниц генотипа E2/E3 — с относительно низким средним уровнем общего холестерина при относительно высоком уровне холестерина ЛПВП и умеренном - триглицеридов. При сравнении уровней липидов в попу-

Таблица 3
Средние уровни липидов крови для разных генотипов по полиморфизму кодирующей части гена APOE

Генотип	ОХС (мг/дл)	ТГ (мг/дл)	ЛПВП (мг/дл)
г. Новосибирск			
E2/E4	206,66	122,74	51,91
E2/E3	193,63	112,67	58,86
E3/E3	207,24	100,87	57,37
E3/E4	198,21	102,99	54,06
E4/E4	238,33	95,61	68,41
Горная Шория			
E2/E4	256,56	107,76	50,50
E2/E3	207,86	134,06	48,53
E3/E3	185,21	106,34	53,41
E3/E4	225,25	106,52	51,39
E4/E4	284,07	161,31	41,47
Чукотский автономный округ			
E2/E4	-	-	-
E2/E3	-	-	-
E3/E3	177,65	81,42	58,22
E3/E4	196,75	91,49	61,06
E4/E4	182,55	57,80	73,20
Хакасия			
E2/E4	253,20	131,40	51,40
E2/E3	196,86	112,86	57,86
E3/E3	207,16	104,59	56,41
E3/E4	222,82	127,75	52,22
E4/E4	229,00	101,00	44,50

ляции и у геронтов в аналогичных генотипических классах гена *APOE* выявлено, что у геронтов во всех генотипических классах ниже как общий холестерин, так и холестерин липопротеидов низкой плотности.

В популяции шорцев максимальное значение среднего уровня ОХС выявлено также при генотипе E4/E4 ($p < 0,05$), наличие данного генотипа определяет повышение среднего уровня ОХС на 98 мг/дл по сравнению с генотипом E3/E3. Минимальные значения среднего уровня ОХС определяются при генотипе E3/E3. Выявлены более высокие значения среднего уровня ОХС при генотипе E2/E4, E3/E4 и E2/E3 по сравнению с генотипом E3/E3 как у мужчин, так и у женщин. В общей факторной модели в популяции шорцев обнаружена статистически значимая связь с полиморфизмом кодирующей части гена *APOE* и возрастом для ОХС ($p = 0,000$).

В популяции коренных жителей Чукотского автономного округа достоверные отличия в уровнях липидных показателей обнаружены для ОХС у женщин при сравнении двух наиболее частых генотипических классов. Для мужчин не обнаружено значимого эффекта полиморфизма *APOE* ни для одного из проанализированных показателей. Эффект, наблюдаемый у женщин, состоит в повышении уровня ОХС в случае генотипа E3/E4 по сравнению с генотипом E3/E3. Уровни ТГ и ХС ЛПВП достоверно не различались между генотипическими классами во всех обследованных выборках.

Популяция коренных жителей Хакасии близка по средним значениям уровней липидов крови к популяции г. Новосибирска и Горной Шории. Достоверных отличий средних уровней липидов крови между генотипическими классами не выявлено. Подобно другим популяциям отмечается тенденция к повышению ОХС у носителей аллеля E4.

Таким образом, влияние полиморфизма гена *APOE* на уровни липидных показателей в популяции г. Новосибирска, у коренного населения Чукотки, коренных жителей Горной Шории и коренных жителей Хакасии качественно различается.

При обследовании выборки больных с инфарктом миокарда г. Новосибирска частота генотипов гена *APOE* статистически значимо не отличалась от популяционной. В группе больных отсутствуют носители генотипов E2/E2, E2/E4, E4/E4, что может объясняться попаданием носителей этих генотипов в группу фатальных инфарктов и инсультов. Частота аллелей составила: E2 — 7,69%, E3 — 83,08%, E4 — 9,23%. Снижения частоты аллеля E4 относительно популяционной статистически не значимо.

При сравнении с популяцией коренных жителей Хакасии частота в группе перенесших инфаркт миокарда аллелей гена *APOE* составила: E2 — 6,25%, E3 — 81,25%, E4 — 12,5%. Снижение частоты аллеля E4 в данной группе также статистически не значимо.

Обращает на себя внимание следующий факт. Среди лиц преклонного возраста и долгожителей, как мужчин, так и женщин, отсутствовали носители генотипа E4/E4, что отчасти можно объяснять предрасположенностью этих лиц к развитию болезни Альцгеймера. Согласно данным исследования, выполненного на новосибирской популяции [9], частота генотипа E4/E4 у лиц с болезнью Альцгеймера в 2,5 раза превышала частоту гомозигот в контрольной группе. Кроме этого, частота генотипа E3/E4 у лиц с болезнью Альцгеймера также более чем в 1,5 раза превышала частоту носителей этого генотипа в контрольной группе. Следовательно, можно предположить, что значительное снижение доли носителей этого генотипа среди лиц старческого возраста и долгожителей по сравнению с популяцией было связано не только с наличием атеросклероза и его осложнениями, но и в определенной мере с болезнью Альцгеймера.

В группе лиц, перенесших инсульты, частота аллелей гена *APOE* составила E2 — 7,10%, E3 — 79,05%, E4 — 13,85%. Выявлено повышение частоты генотипа E2/E4 в 2 раза в сравнении с популяцией г. Новосибирска. При анализе средних показателей липидов сыворотки крови не было выявлено достоверных различий между разными генотипическими классами у больных, перенесших инсульт.

Распределение аллелей гена аполипопротеина E у женщин с ЖКБ составило: аллель E2 — 9,8%, E3 — 80,4%, E4 — 9,8%. Различия в частоте аллелей у женщин с ЖКБ в сравнении с соответствующими показателями у женщин без ЖКБ в популяции статистически незначимы.

Генотип E2/E3 обнаружен у 16,5% лиц, что в 1,5 раза превышало соответствующую частоту у женщин без ЖКБ в популяции (10,8%, $p = 0,08$) [4]. Частота генотипа E3/E4 у женщин с ЖКБ (17,6%) была незначительно ниже, чем у женщин без ЖКБ в популяции (24,3%, $p > 0,05$). Генотип E3/E3 обнаружен у 63,7% обследованных лиц, что практически не превышало соответствующую частоту в популяционном исследовании (62,2%, $p > 0,05$). Генотипы E2/E2 и E4/E4 в данной выборке не выявлены. Частота генотипа E2/E4 составила 2,2%. Распределение частот генотипов соответствует равновесию Харди-Вайнберга ($p > 0,05$).

При анализе средних показателей липидов сыворотки крови не было выявлено достоверных различий между разными генотипическими классами у больных с ЖКБ, хотя отмечена общая тенденция к увеличению уровня ОХС и ХС-ЛПНП у больных ЖКБ носителей аллеля E4.

При анализе связи полиморфизма гена *APOE* с индексом массы тела в обследованных популяциях статистически значимых ассоциаций не выявлено. При выделении в популяции г. Новосибирска групп с нормальной массой тела ($ИМТ < 25$) и повышенной массой тела ($ИМТ \geq 25$), наблюдаются различия в частоте аллелей E4 - 10 и 14%, соответственно, но эти значения не достигают уровня статистической значимости. В популяции шорцев в группе с нормальной массой тела ($ИМТ < 25$) и повышенной массой тела ($ИМТ \geq 25$) наблюдаются различия в частоте аллелей E4 - 16,4 и 25,9%, соответственно, различия являются статистически значимыми ($\chi^2=4,293$; $P=0,029$). В нашем исследовании не обнаружено влияния полиморфизма гена *APOE* на ИМТ, но выявлено повышение частоты избыточной массы тела у шорцев в ряду генотипов, содержащих аллель E4, что может быть обусловлено ассоциацией нарушений липидного обмена и развитием ожирения. Чрезмерное развитие абдоминальной жировой ткани сочетается со снижением утилизации глюкозы, стимулированной инсулином, с уменьшением экстракции инсулина печенью и с повышенной секрецией инсулина в поджелудочной железе. В условиях инсулинорезистентности и нарушений в обмене глюкозы изменяется взаимодействие апобелков с рецепторами, более выраженное в присутствии аллеля E4. Полученные нами данные не противостоят результатам исследований Marques-Vidal P. 2003 и Гмошинской А.А. 2003 [2, 28]

На следующем этапе был изучен полиморфизм промотора гена *APOE* в популяциях г. Новосибирска и коренных жителей Горной Шории.

Результаты анализа распределения частот генотипов и аллелей полиморфизма промотора гена *APOE* в обследованных выборках представлены в таблице 4.

В популяции г. Новосибирска было обследовано 150 человек. Частота более редкого аллеля T составила 19,7%. В популяции шорцев также обследовано 150 человек, частота более редкого аллеля T составила 16,3%. Достоверных отличий по частотам аллелей между популяциями не выявлено ($\chi^2=1,129$; $P=0,169$). Распределение частот генотипов в популяциях соответствует равновесию Харди-Вайнберга. Статистически значимой динамики изменения частот генотипов и аллелей в разных возрастных декадах не выявлено.

При анализе частоты генотипов по полиморфизму *APOE* -491A/T у лиц-носителей E4 аллеля и лиц без E4 аллеля статистически значимых различий не выявлено в обеих популяциях.

В обеих изученных популяциях во всех возрастных группах, как у мужчин, так и у женщин, не выявлено связи полиморфизма промотора гена *APOE* с уровнями липидов крови.

При анализе связи полиморфизма промоторной области гена *APOE* с уровнем глюкозы крови натощак в популяции шорцев в присутствии аллеля T выявлены более высокие средние уровни глюкозы крови, но эти различия не достигают уровня статистической значимости. При анализе связи полиморфизма промоторной области гена *APOE* с уровнем глюкозы крови после проведения теста толерантности к глюкозе в популяции коренных жителей Горной Шории выявлено статистически значимое повышение средних уровней глюкозы крови в присутствии аллеля T (Таблица 5).

В популяции г. Новосибирска выявлена связь полиморфизма промотора гена *APOE* со средними уровнями систолического и диастолического артериального давления. Генотипы, содержащие аллель T, связаны с более низкими уровнями как систолического, так и диастолического артериального давления (Таблица 6). В популяции Горной Шории подобной связи не обнаружено.

Обсуждение

В сопоставлении с данными по популяциям различных регионов Земного шара распределение частоты аллеля E4 в различных этнических группах сформировано, по-видимому, механизмами адаптации к условиям внешней среды. По данным Fullerton S. et al. [14], аллель E4 является наиболее ранним эволюционным вариантом. Популяции, сохраняющие до последнего времени уклад жизни охотников-собирателей и обладающие более высокими частотами E4, обладают оптимальным адаптационным потенциалом в условиях нерегулярного поступления пищевых продуктов. В популяциях с современным типом питания, регулярным поступлением пищевых продуктов наблюдаются более высокие частоты аллеля E2, эволюционно наиболее молодого варианта полиморфизма кодирующей части гена *APOE*. Существует предположение, что распространение данного аллеля коррелирует с возникновением первичных центров земледелия в мире [1].

В нашем исследовании обнаружена достоверная связь между разными генотипами полиморфизма кодирующей части гена *APOE* и некоторыми факторами риска ХНИЗ. Таким образом, выявленные ассоциации полиморфизма

Таблица 4
Частоты аллелей и генотипов по полиморфизму промотора гена APOE в популяции г. Новосибирска и коренных жителей Горной Шории

	Новосибирск	Горная Шория
	P(sp)	P(sp)
Генотипы		
AA	0,627 (0,040) n=94	0,687 (0,038) n=103
AT	0,353 (0,039) n=53	0,300 (0,037) n=45
TT	0,020 (0,011) n=3	0,013 (0,009) n=2
Аллели		
A	0,803 (0,069)	0,837 (0,064)
T	0,197 (0,069)	0,163 (0,064)
Показатели соответствия равновесию Харди-Вайнберга		
χ^2	2,097	0,864
P	0,201	0,258

Таблица 5
Уровень глюкозы крови (ммоль/л) для разных генотипов по полиморфизму промотора гена APOE в популяции коренных жителей Горной Шории

Генотипы	Глюкоза крови натощак		Глюкоза крови после теста толерантности	
	Мужчины	Женщины	Мужчины	Женщины
	X(Sx)	X(Sx)	X(Sx)	X(Sx)
AA	4,2 (0,1) n=21	4,5 (0,1) n=82	5,6 (0,2) n=21	6,1 (0,1) n=82
AT	4,5 (0,2) n=8	4,7 (0,1) n=37	6,0 (0,3) n=8	6,4 (0,2) n=37
TT	- n=0	4,9 (0,5) n=2	- n=0	6,4 (0,9) n=2
Возраст (p)	0,000		0,059	
ИМТ (p)	0,004		0,061	
Пол (p)	0,122		0,019	
Генотип (p)	0,150		0,015	

Таблица 6
Уровни артериального давления (мм. рт. ст.) для разных генотипов по полиморфизму промотора гена APOE в популяции г. Новосибирска

Генотипы	САД		ДАД	
	Мужчины	Женщины	Мужчины	Женщины
	X(Sx)	X(Sx)	X(Sx)	X(Sx)
AA	133 (2)	140 (5)	85 (1)	87 (3)
AT	124 (2)	132 (5)	80 (1)	81 (3)
TT	116 (10)	123 (10)	77 (6)	78 (6)
Возраст (p)	0,000		0,011	
ИМТ (p)	0,010		0,000	
Пол (p)	0,127		0,707	
Генотип (p)	0,009		0,006	

гена APOE с уровнями липидов крови в обследованных группах подтверждают перспективность внедрения генотипирования по данному гену для диагностики ряда дислипидемий и рационализации схем их коррекции в работе специализированных липидных центров с учетом имеющегося мирового опыта, а также оценки индивидуального риска ишемической болезни сердца. Кроме этого, в целом ряде исследований показана необходимость внедрения массового генотипирования по гену APOE.

В проспективном исследовании пациентов с серьезными тупыми травмами головы Friedman и соавторы [16] обнаружили, что у индивидуумов с E4 аллелем в 6 раз чаще бывает более чем 7-дневное бессознательное состояние и в 14 раз чаще имеется остаточная неврологическая симптоматика спустя 6 месяцев после травмы — по сравнению с теми, кто не имеет этого аллеля.

Как известно, первичная профилактика заболеваний намного эффективней вторичной, но для ее проведения необходимо сформировать группы повышенного риска заболевания. Одним из важных критериев при формировании таких групп, безусловно, является семейный анамнез. При этом в каждой семье важно выявлять лиц с наиболее высоким риском развития заболевания и ведущие факторы риска. Исследования молекулярно-генетических маркеров наследственной предрасположенности позволяют решить эту задачу и сделать первичную профилактику индивидуальной, целенаправленной, патогенетически обоснованной, эффективной и более дешевой.

Генотипирование по гену APOE может быть использовано для выявления среди родственников больных лиц с повышенным риском развития инфаркта миокарда, инсульта, нарушений липидного обмена, болезни Альцгеймера, выявления среди больных с болезнью Альцгеймера лиц с повышенным риском развития тяжелой деменции. Выявления среди больных с повышенными уровнями общего ХС, ХС ЛПНП и пониженным содержанием ХС ЛПВП носителей аллеля E4 с последующей коррекцией проводимой терапии.

Функциональное значение разных аллелей одного гена существенно отличается в разных климатических и экологических условиях, зависит от характера питания, возраста, пола, этнической принадлежности. Только изучение полиморфизма отдельного гена в разных этнических, половых, возрастных группах, а также поиск ассоциаций с широким спектром состояний позволит составить наиболее полное представление об этом гене и, следовательно, о возможных способах и последствиях воздействия на него.

Проблема старения и сохранения активной старости является актуальной для современного общества. Это обусловлено, с одной стороны, снижением средней продолжительности жизни в целом, а с другой — ростом удельного веса пожилых людей в мире и России. По этой причине актуальным моментом настоящего исследования является оценка полиморфизма гена *APOE*, оказывающего существенное влияние на состояние сердечно-сосудистой системы. Долгожители несут в себе уникальный потенциал наследственного здоровья, сохраненного в условиях современного образа жизни. В этой связи молекулярно-генетические исследования среди этой группы людей, с учетом природно-географических, социальных и экологических факторов представляют интерес, как в научном, так и в прикладном аспекте.

Выявленная связь полиморфизма гена *APOE* с патологией в обследованных популяциях подтверждает перспективность изучения генов-кандидатов и создание программ профилактики ХНИЗ с учетом этнического состава населения.

Работа выполнена при поддержке гранта РГНФ №02-06-00280а, гранта РГНФ №03-06-00487а, гранта Фонда содействия отечественной медицине. Авторы также благодарят за помощь в подготовке публикации Е.В. Шахтшнейдер, М.Ю. Огаркова, О.В. Янченко, Т.М. Никитенко, А.В. Суханова, С.В. Шишкина, Л.Д. Дамба, И.В. Куликова, С.Н. Устинова, О.Л. Барбараиш, Н.С. Юдина, О.М. Поликутину, Я.В. Казачек, М.В. Иванову, В.А. Баума, И.Н. Григорьеву, В.Ф. Кобзева

APOLIPOPROTEIN E POLYMORPHISM IN SIBERIA POPULATIONS AND ITS ASSOCIATION WITH PATHOLOGY

M.I. Voevoda, V.A. Stepanov, A.G. Romashchenko, V.N. Maksimov

Polymorphism genes assay is of importance at estimation of predisposition to multifactorial diseases on population and individual level. We investigated apolipoprotein E polymorphism and its influence on a pathology in population of Siberia: populations of Novosibirsk city (the largest scientific and industrial centre of West Siberia) and native populations of Mountain Shoriya, Chukotka, the Khanty- Mansiysk Autonomous region, the North Altai, Khakassia. While studying the link of apolipoprotein E polymorphisms with some chronic infectious diseases and their risk factors have been revealed.

Литература

1. Воевода М.И. Полиморфизм и связь с факторами риска некоторых генов предрасположенности к сердечно-сосудистым заболеваниям в этнических группах Сибири. Молекулярно-эпидемиологические и эволюционно-генетические аспекты: Автореф. дисс. ... д-ра мед. наук / М.И. Воевода. — Новосибирск, 2001.
2. Гмошинская А.А. Лептин крови у лиц с различной массой тела: Автореф. ... канд. мед. наук. / А.А. Гмошинская. — Новосибирск, 2003.
3. Некоторые молекулярно-генетические аспекты атерогенеза в этнических группах Сибири / М.И. Воевода, С.Н. Устинов, И.В. Куликов и др. // Сборник трудов юбилейной научной сессии НИИ терапии СО РАМН. — 2002. — С. 45-50.
4. Полиморфизм аполипопротеина E и факторы риска желчнокаменной болезни у женщин с ЖКБ (пилотное эпидемиологическое исследование) / И.Н. Григорьева, Е.В. Шахтшнейдер, С.Н. Устинов и др. // Тезисы докл. 7-ой Российской конференции «Гепатология сегодня». — Москва, 2002. — С. 57.
5. Полиморфизм генов липидтранспортной системы крови у пациентов с нестабильной стенокардией и сахарным диабетом / Д.В. Привалов, О.С. Чумакова, И.В. Зотова и др. // Вестник РАМН. — 2003. — Т. 1. — С. 40-43.
6. Смит К. Пульс-электрофорез и методы работы с большими молекулами ДНК / К. Смит, С. Калко, Ч. Кантор // Анализ генома. Под ред. К. Дейвиса, пер. с англ. — М., 1990. — С. 58-94.
7. A polymorphism in the regulatory region of *APOE* associated with risk for Alzheimer's dementia / M.J. Bullido, M.J., Artiga M., Recuero et al. // Nature genetics. — 1998. — Vol. 18. — P. 69-71.
8. ApoE Polymorphism and Fish Oil Supplementation in Subjects With an Atherogenic Lipoprotein Phenotype / A.M. Minihane, S. Khan, E.S. Leigh-Firbank et al. // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. — 2000. — Vol. 20 (8). — P. 1990-1997.
9. Apolipoprotein E allele frequency in Alzheimer's disease — in west Siberia population / A.V. Sukhanov, E.V. Shakhshneider, P.I. Pilipenko et al. // VI European congress of clinical gerontology. — Russia. Moscow, 2002. — P. 161.
10. Apolipoprotein E alleles and Risk of Coronary Disease: A Meta-analysis. / P.W.F. Wilson, E.J. Schaefer, M.G. Larson, J.M. Ordovas // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. — 1996. — Vol. 16 (10). — P. 1250-1255.
11. Apolipoprotein E and apolipoprotein CI polymorphisms in the Czech population: almost complete linkage disequilibrium of the less frequent alleles of both polymorphisms / J.A. Hubacek, J. Pitha, V.V. Adamkovic, et al. // Physiol Res. — 2003. — Vol. 52 (2). — P. 195-200.
12. Apolipoprotein E Polymorphism and LDL Size in a Biethnic Population / S.M. Haffner, M.P. Stern, H. Miettinen et al. // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. — 1996. — Vol. 16 (9). — P. 1184-1188.
13. Apolipoprotein E Polymorphism in American Indians and Its Relation to Plasma Lipoproteins and Diabetes: The Strong Heart Study / S. Kataoka, D.C. Robbins, L.D. Cowan et al. // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. — 1996. — Vol. 16 (8). — P. 918-925.

14. Apolipoprotein E variation at the sequence haplotype level: implications for the origin and maintenance of a major human polymorphism / S.M. Fullerton, A.G. Clark, K.M. Weiss et al. // *Am. J. Hum. Genet.* — 2000. — Vol. 67 (4). — P. 881-900.
15. Apolipoprotein E: High avidity binding to b-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease / W. Strittmatter, A. Saunders, D Schmechel. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* — 1993. — Vol. 90. — P. 1977-1981.
16. Apolipoprotein E-epsilon-4 genotype predicts a poor outcome in survivors of traumatic brain injury / G. Friedman, P. Froom, L. Sazbon et al // *Neurology.* 1999. — Vol. 52. — P. 244-248.
17. Apolipoprotein-E dependent role for the FAS receptor in early onset Alzheimer's disease: finding of a positive association for a polymorphism in the TNFRSF6 gene / L. Feuk, J.A. Prince, G. Breen et al. // *Hum. Genet.* — 2000. — Vol. 107. — P. 391-396.
18. Characterization of apolipoprotein E genetic variations in Taiwanese: association with coronary heart disease and plasma lipid levels / J.H. Wu, S.K. Lo, M.S. Wen, J.T. Kao // *Hum. Biol.* — 2002. — Vol. 74 (1). — P. 25-31.
19. Davignon J. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis / J. Davignon, R.E. Gregg, C.F. Sing // *Arteriosclerosis.* — 1988. — Vol. 8. — P. 1-21.
20. Genetic associations with human longevity at the APOE and ACE loci. / F. Schachter, L. Faure-Delanef, F. Guenot et al. // *Nature Genetics.* — 1994. — Vol. 6. — P. 29-32.
21. Genetic heterogeneity of apolipoprotein E and its influence on plasma lipid and lipoprotein levels / de P. Knijff, van den A.M. Maagdenberg, R.R. Frants, L.M. Havekes // *Hum. Mutat.* — 1994. — Vol. 4. — P. 178-194.
22. Heritabilities of apolipoprotein and lipid levels in three countries / M. Beekman, B.T. Heijmans, N.G. Martin et al. // *Twin. Res.* — 2002. — Vol. 5 (2). — P. 87-97.
23. Hixon J.E. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI / J.E. Hixon, D.T. Vernier // *J. of Lipid Research.* — 1990. — Vol. 31. — P. 545-548.
24. Independent association of an APOE gene promoter polymorphism with increased risk of myocardial infarction and decreased APOE plasma concentrations — the ECTIM Study / J-C. Lambert, T. Brousseau, V. Defoss et al. // *Hum. Mol. Genet.* — 2000. — Vol. 9. — № 1. — P. 57-61.
25. Isolation, characterization, and mapping to chromosome 19 of the human apolipoprotein E gene / H.K. Das, J. McPherson, G.A.P. Bruns et al. // *J. Biol. Chem.* — 1985. — Vol. 260. — P. 6240-6247.
26. Joint Effect of the APOE Gene and Midlife Systolic Blood Pressure on Late-Life Cognitive Impairment: The Honolulu-Asia Aging Study Editorial Comment: The Honolulu-Asia Aging Study / R. Peila, L.R. White, H. Petrovich et al. // *Stroke.* — 2001. — Vol. 32 (12). — P. 2882-2889.
27. Kukull W. APO E Polymorphisms and Late-Onset Alzheimer Disease / W. Kukull, G.M. Martin // *JAMA.* — 1998. — Vol. 279 (10). — P. 788-789.
28. Obesity and alcohol modulate the effect of apolipoprotein E polymorphism on lipids and insulin / P. Marques-Vidal, V. Bongard, J.B. Ruidavets et al. // *Obes. Res.* — 2003. — Vol. 11 (10). — P. 1200-1206.
29. SNPing away at complex diseases: analysis of single-nucleotide polymorphisms around APOE in Alzheimer disease / E.R. Martin, E.H. Lai, J.R. Gilbert et al. // *Am. J. Hum. Genet.* — 2000. — Vol. 67. — P. 383-394.
30. Szalai C. Influence of apolipoprotein E genotypes on serum lipid parameters in a biracial sample of children / C. Szalai, A. Czinner, A. Csaszar. // *Eur. J. Pediatr.* — 2000. — Apr. — Vol. 159 (4). — P. 257-260.
31. Utermann G. Apolipoprotein polymorphism and multifactorial hyperlipidaemia. / G. Utermann // *J. Inher. Metab. Dis.* — 1988. — Vol. 1. — P. 74-86.