

Получена: 4 сентября 2016 / Принята: 11 октября 2016 / Опубликовано online: 31 октября 2016

УДК 616-092+577.21

ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ВАРИАНТОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ГИПЕРТОНИЕЙ, ОЖИРЕНИЕМ И ДИАБЕТОМ У ЛИЦ КАЗАХСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ ДЛЯ ПОСЛЕДУЮЩЕГО ИЗУЧЕНИЯ ВЗАИМОСВЯЗЕЙ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ВАРИАНТОВ И МЕТАБОЛОМА

Айнур Р. Акильжанова¹, Улан А. Кожамкулов¹, Улыкбек Е. Каиров², Сауле Е. Рахимова¹, Айнур Ж. Ахметова¹, Даурен А. Ережепов¹, Асхат Б. Молкенов², Жаннур М. Абилова¹, Жаксыбай Ш. Жумадилов¹

¹ Лаборатория геномной и персонализированной медицины Центра Наук о жизни, National Laboratory Astana, Назарбаев Университет, Астана, Казахстан;

² Лаборатория биоинформатики и вычислительной системной биологии Центра Наук о жизни, National Laboratory Astana, Назарбаев Университет, Астана, Казахстан

Резюме

В данной работе проведена характеристика генетических вариантов, ассоциированных с гипертонией, ожирением и диабетом и проведено сравнение геномных данных 60 образцов с международной базой данных T-HOD (The Text-mined Hypertension, Obesity and Diabetes candidate gene database (T-HOD)).

Проанализированы генетические варианты, выделенные из полных геномов и экзонов и показавшие ассоциацию с развитием гипертонии, ожирением и диабетом по обоим алгоритмическим предикторам патогенности мутаций PolyPhen2 и SIFT. Обнаружено семь генетических вариантов GHRL (rs4684677), MTHFR (rs1801133), OPRM1 (rs1799971), ERBB2 (rs1058808), BDNF (rs6265), PNPLA3 (rs738409), MTRR (rs1801394) генов.

В дальнейшем планируется интеграция данных метаболома и кодирующих и некодирующих генетических вариантов, выявленных из геномного анализа, изменяющих уровень метаболитов в клеточной системе.

Ключевые слова: полные экзоны, геномы, метаболомные исследования, гипертония, ожирение, диабет

Abstract

DETERMINATION OF GENETIC VARIANTS ASSOCIATED WITH HYPERTENSION, OBESITY AND DIABETES IN KAZAKH POPULATION TO STUDY INTERACTION OF GENETIC VARIANTS AND METABOLOME

Ainur Akilzhanova¹, Ulan Kozhamkulov¹, Ulykbek Kairov², Saule Rakhimova¹, Ainur Akhmetova¹, Dauren Yerezhepov¹, Askhat Molkenov², Zhannur Abilova¹, Zhaxybay Zhumadilov¹

¹Laboratory of Genomic and Personalized Medicine, Center for Life Sciences, National Laboratory Astana, Nazarbayev University, Astana, Kazakhstan;

²Laboratory of Bioinformatics and Computational Systems Biology, Center for Life Sciences, National Laboratory Astana, Nazarbayev University, Astana, Kazakhstan.

Работа выполнена в рамках проекта «Интеграционный геномный и метаболомный анализ кардиометаболических нарушений в казахской популяции» по бюджетной программе МОН РК 3907/ГФ4 «Грантовое финансирование научных исследований» на 2015-2017 гг.

In this work genetic variants associated with hypertension, obesity and diabetes were characterized, and genomic data of 60 samples were compared using T-HOD (The Text-mined Hypertension, Obesity and Diabetes candidate gene database (T-HOD) international database.

Genetic variants extracted from whole genomes and exomes, and associated with hypertension, obesity and diabetes based on PolyPhen2 and SIFT algorithmic predictors of mutation pathogenicity were analyzed. Seven genetic variants were detected in GHRL (rs4684677), MTHFR (rs1801133), OPRM1 (rs1799971), ERBB2 (rs1058808), BDNF (rs6265), PNPLA3 (rs738409), MTRR (rs1801394) genes.

In the future metabolomic data and data on coding and non-coding genetic variants determined from genomic analysis, that change the level of metabolites in cell system will be integrated.

Key words: whole exomes, genomes, metabolomic studies, hypertension, obesity, diabetes

Түйін

ГЕНЕТИКАЛЫҚ ВАРИАНТТАР МЕН МЕТАБОЛОМНЫҢ ӨЗАРА БАЙЛАНЫСЫН АНЫҚТАУ ҮШІН ҚАЗАҚ ПОПУЛЯЦИЯСЫНДА ГИПЕРТОНИЯ, СЕМІЗДІК ЖӘНЕ ДИАБЕТПЕН АССОЦИАЦИЯЛАҢҒАН ГЕНЕТИКАЛЫҚ ВАРИАНТТАРДЫ ЗЕРТТЕУ

**Айнур Р. Акильжанова¹, Улан А. Кожамкулов¹, Улыкбек Е. Каиров²,
Сауле Е. Рахимова¹, Айнур Ж. Ахметова¹, Даурен А. Ережепов¹,
Асхат Б. Молкенов², Жаннур М. Абилова¹, Жаксыбай Ш. Жумадилов¹**

¹ Геномды және дербес медицина зертханасы, Өмір туралы ғылымдар орталығы, National Laboratory Astana, Назарбаев Университеті, Астана, Қазақстан;

² Биоинформатика және есептеуіш жүйелік биология зертханасы, Өмір туралы ғылымдар орталығы, National Laboratory Astana, Назарбаев Университеті, Астана, Қазақстан

Аталған жұмыста гипертония, семіздік және диабетпен ассоциацияланған генетикалық нұсқалар сипатталды, және 60 үлгінің геномдық мәліметтері T-HOD (The Text-mined Hypertension, Obesity and Diabetes candidate gene database (T-HOD) халықаралық мәліметтер базасымен салыстырылды.

Толық геномдар мен экзомдардан бөлініп алынған, PolyPhen2 және SIFT мутациялар патогенділігінің алгоритмдік предикторлары бойынша гипертония, семіздік және диабетпен ассоциацияны көрсеткен генетикалық нұсқалар анализденді. Жеті генетикалық нұсқалар GHRL (rs4684677), MTHFR (rs1801133), OPRM1 (rs1799971), ERBB2 (rs1058808), BDNF (rs6265), PNPLA3 (rs738409), MTRR (rs1801394) гендерінде анықталды.

Келешекте метаболом және жасушалық жүйеде метаболиттер деңгейін өзгертетін, геномдық анализден анықталған кодталған және кодталмаған генетикалық нұсқалар мәліметтерін интеграциялау жоспарлануда.

Түйін сөздер: толық экзомдар, геномдар, метаболомды зерттеулер, гипертония, семіздік, диабет.

Библиографическая ссылка:

Акильжанова А.Р., Кожамкулов У.А., Каиров У.Е., Рахимова С.Е., Ахметова А.Ж., Ережелов Д.А., Молкенов А.Б., Абилова Ж.М., Жумадилов Ж.Ш. Исследование генетических вариантов, ассоциированных с гипертонией, ожирением и диабетом у лиц казахской популяции для последующего изучения взаимосвязей генетических вариантов и метаболома // Наука и Здравоохранение. 2016. №4. С. 30-42.

Akilzhanova A.R., Kozhamkulov U.A., Kairov U.Ye., Rakhimova S.Ye., Akhmetova A.Zh., Yerezhepov D.A., Molkenov A.B., Abilova Zh.M., Zhumadilov Zh.Sh. Determination of genetic variants associated with hypertension, obesity and diabetes in kazakh population to study interaction of genetic variants and metabolome. *Nauka i Zdravookhranenie* [Science & Healthcare]. 2016, 4, pp. 30-42.

Акильжанова А.Р., Кожамкулов У.А., Каиров У.Е., Рахимова С.Е., Ахметова А.Ж., Ережелов Д.А., Молкенов А.Б., Абилова Ж.М., Жумадилов Ж.Ш. Генетикалық варианттар мен метаболомның өзара байланысын анықтау үшін қазақ популяциясында гипертония, семіздік және диабетпен ассоциацияланған генетикалық варианттарды зерттеу // Ғылым және Денсаулық сақтау. 2016. №4. Б. 30-42.

Введение

Эпидемический рост ожирения, инсулинорезистентности и диабета 2 типа поставили общество под драматический рост риска развития атеросклеротических заболеваний и последующего роста смертности во всем мире [28,7,9,13,5]. Эти промежуточные состояния и биомаркеры находятся под строгим влиянием стиля жизни, диеты, генетических факторов. Роль этих факторов значительно отличается среди различных популяций, так например генетические варианты и их роль в развитии заболевания в одной популяции могут быть неприменимы для другой популяции.

Многие исследования показали, что развитию сердечных, метаболических заболеваний способствуют генетические факторы риска, факторы окружающей среды и образа жизни [6]. Широкомасштабные геномные ассоциативные исследования (GWAS) выявили более сотни полиморфизмов (SNP), которые ассоциированы с сердечно-сосудистыми заболеваниями, метаболическими нарушениями и ожирением [18,10,16].

Таким образом, очевидно, что генетические факторы играют очень важную роль определении риска заболеваний; однако, величина эффекта для каждого из генетических вариантов слаба, предположительно, что несколько генетических вариантов оказывают сильный эффект, а большинство различных генетических вариантов имеют незначительный эффект. Кроме того, многие эпидемиологические исследования выявили

этнические различия в распространенности и преобладании метаболического синдрома (например, выходцы из Южной Азии > Латиноамериканцы > белокожие > темнокожие). Выходцы из Южной Азии, мигрировавшие в Великобританию, имеют повышенный риск развития метаболических нарушений [6], что демонстрирует важность взаимосвязи «ген - окружающая среда». Многочисленные исследования показали, что, несмотря на важность вопроса, очень трудно изучить взаимодействие «ген - окружающая среда» [12,19,20,23], даже массивные GWAS исследования вряд ли смогут ответить на все вопросы [19,23].

Распространенность сердечно-сосудистых заболеваний в Казахстане является одной из самых высоких в мире [26], и ишемическая болезнь сердца и цереброваскулярные заболевания являются самыми высокими в евразийском регионе, в том числе Европы, России и Центральной Азии [26]. В большом масштабном эпидемиологическом исследовании, проведенном в Синьцзяне, Китай [27], распространенность артериальной гипертензии была в 2 раза выше у казахов, чем в других этнических группах, но распространенность гипергликемии среди них была низкой (4,7%). Кроме того, центральное ожирение было более распространено у казахов (48%), чем у других этнических групп.

Метаболомика является быстро развивающейся областью, которая обеспечивает новыми биологическими идеями. Определяемая как научное изучение химических процессов, вовлекающих малые

Работа выполнена в рамках проекта «Интеграционный геномный и метаболомный анализ кардиометаболических нарушений в казахской популяции» по бюджетной программе МОН РК 3907/ГФ4 «Грантовое финансирование научных исследований» на 2015-2017 гг.

молекулярные метаболиты, метаболомика направлена систематически изучать уникальные химические особенности клеточных процессов, представляющих коллекции профилей метаболитов в данной точке [8].

Метаболом представляет собой совокупность всех метаболитов, являющихся конечным продуктом обмена веществ в клетке, ткани, органе или организме [11]. В то время как данные об экспрессии мРНК генов и данные протеомного анализа не раскрывают полностью всего того, что может происходить в клетке, метаболомические профили могут дать мгновенный снимок физиологических процессов в клетке. Одна из задач системной биологии и функциональной геномики - интегрирование данных геномики, протеомики, транскриптомики и метаболомической информации для получения более целостного представления о живых организмах.

Сегодня метаболомный анализ идентифицирует широкий спектр метаболитов в клетках, тканях или жидкостях организма, в попытках по созданию библиотек метаболомных биомаркеров для различных состояний заболеваний. Существуют международные базы данных метаболомов.

Учитывая сложную историю формирования казахской популяции, казахи могут иметь множество различных генетических и экологических факторов риска. Для решения этих вопросов, мы предлагаем изучить геномный вклад в формирование метаболома на основе секвенирования лиц казахской национальности и дальнейшего изучения их метаболома.

Этот подход является не только экономически эффективным, т.к. мы основываемся на результатах секвенирования полного генома и полного экзома казахов, но и расширяет наше понимание функциональной роли влияния этих вариантов на эндотипы (метаболизм), которые отражают биологические или физиологические процессы организма.

Целью исследования является секвенирование полных экзоменов и геномов индивидуумов казахской национальности, о которых собрана полная информация о генеалогии (жуз, род и т.д.), а также их

клинические фенотипы (ожирение, статус заболевания, например диабет и клинические биомаркеры). В последующем, для этих субъектов, будет проведена интеграция данных метаболома и кодирующих и некодирующих генетических вариантов, выявленных из геномного анализа, изменяющих уровень метаболитов в клеточной системе.

Материалы и методы

Основная идея исследования заключается в комбинировании геномного и метаболомного подходов для исследования ассоциаций генетических вариантов и метаболитов, являющихся предикторами ожирения, диабета и атеросклероза – промежуточных состояний и заболеваний, которые являются общими для казахов и других популяций мира. В данной работе были отобраны 60 участников исследования казахской национальности, для которых было проведено определение последовательности полного экзома с использованием технологии секвенирования нового поколения (NGS) HiSeq2000, Illumina в период 2013-2015 годы. В дальнейшем, мы будем проводить метаболомные исследования и анализ метаболомных данных участников исследования.

Протокол исследования, информированное согласие и все виды рекрутинга были рассмотрены на Локальном этическом комитете «Центра наук о жизни» (выписка из протокола №16 от 11.03.2015г. заседания Этической комиссии ЧУ «Центра наук о жизни», АОО «Назарбаев Университет»). До забора биологических образцов каждому участнику исследования сообщалось о целях и задачах исследования, все участники прочитали и подписали форму информированного согласия и ответили на вопросник, подготовленный для данного проекта.

Рекрутинг участников исследования проводился путем приглашения в исследование на основе добровольного информированного согласия на участие. До забора биологических образцов каждому участнику исследования сообщалось о целях и задачах исследования, все участники прочитали и подписали форму информированного согласия и ответили на

Работа выполнена в рамках проекта «Интеграционный геномный и метаболомный анализ кардиометаболических нарушений в казахской популяции» по бюджетной программе МОН РК 3907/ГФ4 «Грантовое финансирование научных исследований» на 2015-2017 гг.

вопросник, подготовленный для данного исследования.

Критерии включения в исследование – возраст от 18 до 80 лет, казахская национальность, отсутствие хронических заболеваний к моменту исследования. Сбор данных у участников исследования проводили путем анкетирования, опроса, заполнения информационных карт.

Создана электронная база данных, содержащая следующие сведения об участниках исследования:

У каждого участника был проведен забор крови и выделение ДНК из цельной крови (для исследования генома, экзома) и плазма крови (для исследования метаболома).

Для выделения ДНК в работе были использованы наборы для выделения ДНК из крови фирмы Promega, выделение проводилось согласно инструкции фирмы-производителя.

Определение количества и качества образцов ДНК проводилось с помощью спектрофотометра Nanodrop 2000 и проведения гель-электрофореза в 1,5% агарозном геле.

Подготовка и кластеризация библиотек ДНК.

Далее необходимое количество ДНК отбиралось для приготовления библиотек ДНК для секвенирования полного экзома и полного генома.

Библиотеки готовились согласно стандартизованным протоколам Illumina. Для подготовки библиотеки для полногеномного секвенирования использовался TruSeq DNA Sample Preparation протокол, для подготовки библиотек для экзомного секвенирования использовался Sure Select^{XT2} Target Enrichment Systems for Illumina Multiplexed Sequencing протокол.

Технология секвенирования нового поколения предполагает параллельное считывание информации с сотен миллионов кластеров. Это осуществляется за счет дробления ДНК образца на небольшие фрагменты длиной 200-500 нуклеотидов и последующей амплификации полученных фрагментов в ходе подготовительного этапа приготовления библиотеки. Библиотека, или набор фрагментов ДНК, может быть приготовлена как стандартным способом

(фрагментная библиотека), так и способом mate-pair (сопряженная пара). В последнем случае фрагмент вместе с 21 адаптерной последовательностью фиксированного размера лигируется, а чтения в ходе секвенирования будут производиться в обе стороны от известной последовательности. Амплификация полученных фрагментов необходима для усиления сигнала, подаваемого на считывающий механизм после каждого цикла секвенирования. Амплификация фрагментов ДНК на ячейке используется в приборах Illumina. Результатом данного этапа будет являться 100-200 миллионов пространственно разделенных кластеров коротких фрагментов, на концах которых будут находиться праймерные последовательности, необходимые для секвенирования.

ДНК секвенирование.

Секвенирование на платформе Illumina HiSeq2000 с циклической обратимой терминацией заключается в обратимой терминации секвенирования после каждого цикла. Каждый цикл секвенирования начинается с присоединения к праймерной последовательности одного нуклеотида, комплементарного матрице. Нуклеотид помечен флуорофором (одним из четырех цветов) и имеет на 3' блокирующую группу. Не связавшиеся нуклеотиды, присутствующие в растворе, смываются с подложки, за этим следует детекция сигнала от связавшихся нуклеотидов.

Сборка и картирование геномных последовательностей

Секвенатор нового поколения Illumina HiSeq2000 в результате процесса секвенирования путем синтеза, в конечном виде генерирует *.bcl файлы после каждого цикла. Данные *.bcl файлы одновременно конвертировались и демультиплексировались. Картирование и выравнивание сиквенсовых ридов на референсный геном человека версии hg19 проводился с помощью bwa [14] и samtools [15]. Сортировка и индексирование ридов, удаление промежуточных файлов, объединение *.bam файлов, а также идентификация повторов в них осуществлялась с использованием программного пакета PicardTools. Для

Работа выполнена в рамках проекта «Интеграционный геномный и метаболомный анализ кардиометаболических нарушений в казахской популяции» по бюджетной программе МОН РК 3907/ГФ4 «Грантовое финансирование научных исследований» на 2015-2017 гг.

исполнения и запуска программных скриптов были установлены и применялись Java Runtime Environment и R Bioconductor. Фильтрация и детекция геномных вариантов проводилась с помощью GATK [17]. Оценка патогенности полиморфизмов проводилась с помощью алгоритмических предикторов PolyPhen2 и SIFT. Общая схема биоинформатического анализа примененного в нашем исследовании изображена на рисунке 1.



Рисунок 1 – Схема биоинформатического анализа полных геномов и экзонов.

Результаты

Характеристика участников исследования

Для исследования были отобраны 60 участников исследования казахской национальности, для которых было проведено определение последовательности полного экзома с использованием технологии секвенирования нового поколения (NGS) HiSeq2000, Illumina. Исключены лица не казахской национальности, и лица моложе 18 лет.

В таблице 1 представлена характеристика участников исследования.

Участники исследования были разделены на 4 группы:

- 1) Взрослые старше 45лет и имеющие признаки избыточного веса - 6 человек, возраст ≥ 45 , средний ИМТ (индекс массы тела): 31.9 кг/м²;
- 2) Взрослые старше 45лет и без избыточного веса - 11 образцов, возраст ≥ 45 , средний ИМТ: 26.2 кг/м²;
- 3) Взрослые младше 45лет и страдающие ожирением (Young and obese) - 4 образца, возраст < 45 , средний ИМТ: 31.0 кг/м²;
- 4) Взрослые младше 45лет и не страдающие ожирением (Young and non-obese) - 39 образцов, возраст < 45 , средний ИМТ: 23.3 кг/м².

Таблица 1.

Характеристика участников исследования по группам.

Группа исследования	Старше > 45 лет		Младше < 45 лет	
	Избыточный вес	Без избыточного веса	Избыточный вес	Без избыточного веса
Количество, человек	6	11	4	39
Средний возраст, лет	50,3±4,7	52,1±7,1	36,3±8,7	31,5±8,1
Вес, кг	89,3±6,8	74,3±5,9	98,3±6,9	66,6±7,1
Рост, см	165,5±	167,5±	177,8±	168,7±0,6
ИМТ, кг/м ²	32,5±0,8	26,2±0,6	31,0±0,7	23,3±
Объем талии, см	104,0±2,1	111,0±1,7	106,5±1,9	79,4±1,8
Объем бедер, см	90,6±0,9	98,0±0,7	115,8±0,7	96,4±0,6
ОТ/ОБ	0,94	0,89	0,92	0,82
САД, мм рт.ст.	138,0±12,1	118,8±9,2	124,8±6,9	117,1±6,2
ДАД, мм рт.ст.	82,3±8,0	76,7±6,8	77,9±7,0	77,0±6,7

Работа выполнена в рамках проекта «Интеграционный геномный и метаболомный анализ кардиометаболических нарушений в казахской популяции» по бюджетной программе МОН РК 3907/ГФ4 «Грантовое финансирование научных исследований» на 2015-2017 гг.

Характеристика генетических вариантов, ассоциированных с гипертонией, ожирением и диабетом

Для исследования генетических вариантов, ассоциированных с гипертонией, ожирением и диабетом, мы сравнили геномные данные 60 образцов с базой данных T-HOD (The Text-mined Hypertension, Obesity and Diabetes candidate gene database (T-HOD) <http://bws.iis.sinica.edu.tw/THOD>).

В настоящее время все больше исследователей сталкиваются с трудностями следовать за изменением статуса генов-кандидатов заболевания в связи с экспоненциальным ростом картирования генов исследований.

База данных генов-кандидатов гипертонии, ожирения и диабета (T-HOD) разработана, чтобы помочь проследить существующие исследования на трех видах заболеваний: гипертонии, ожирения и диабета, (последний делится на тип 1 и тип 2), с регулярным и полуавтоматическим извлечением информации о генах, связанных с этими заболеваниями, из недавно опубликованной литературы в данной области.

В настоящее время база T-HOD содержит 837, 835 и 821 генов-кандидатов, в при

гипертонии, ожирении и диабете, соответственно. T-HOD использует современные технологии работы с текстовыми документами, включая систему идентификации заболевания - гены, которые могут быть использованы, чтобы подтвердить связь генов с тремя заболеваниями и обеспечить больше доказательств для дальнейшего исследования. Содержание T-HOD регулярно обновляется разработчиками базы данных.

При сравнении с базой T-HOD первоначально выявлено 247 генетических вариантов, связанных с тремя заболеваниями – гипертонией, ожирением и диабетом среди геномных данных у 60 участников исследования. После фильтра значений с отсутствующими показателями осталось 177 генетических вариантов (таблица 2). За отсутствующий показатель по каждому отдельному полиморфизму принималось значение «./», что говорит о недостаточной информации для точной оценки данной позиции в геноме/экзоме или недостаточности сиквенсового покрытия. Поиск 247 генетических вариантов среди полных геномов и экзонов проводился с помощью разработанного Python скрипта «getSNP.py».

Таблица 2.

Количество генетических вариантов, выявленных у 60 образцов при сравнении с базой данных T-HOD.

Параметры	Количество записей до удаления	Количество записей после удаления
Пустые значения «./» с частотой более 55 были удалены	247	177
Параметры аллелей/ генотипов SNP «./»	До порогового значения	После порогового значения
Wild-type GT	8405	4883
Heterozygous GT	2542	2481
Mutant GT	1876	1833
	1097	1069
<i>Примечание:</i> «./» – пустое значение, Wild-type GT – дикий тип, Heterozygous GT – гетерозиготный генотип, Mutant GT – мутантный генотип.		

Детальная функциональная аннотация выявленных полиморфизмов проводилась с помощью алгоритмических предикторов, показывающие вероятность влияния замены аминокислоты на функцию белка - PolyPhen2

(PP2) и SIFT. Они обратно противоположны друг другу по числовому значению.

В таблице 3 представлено количество обнаруженных генетических вариантов по группам исследования. Среди лиц с

Работа выполнена в рамках проекта «Интеграционный геномный и метаболомный анализ кардиометаболических нарушений в казахской популяции» по бюджетной программе МОН РК 3907/ГФ4 «Грантовое финансирование научных исследований» на 2015-2017 гг.

избыточным весом наблюдается большее количество мутантных вариантов, как и среди взрослых лиц младше 45 лет. Необходимы детальные исследования отдельных полиморфизмов.

Были выделены и проанализированы генетические варианты, показавшие ассоциацию с развитием гипертонии, ожирения и диабетом по обоим алгоритмическим предикторам PP2 и SIFT, таких вариантов оказалось 7 в генах rs4684677 GHRL, rs1801133 MTHFR, rs1799971 OPRM1, rs1058808 ERBB2, rs6265 BDNF, rs738409 PNPLA3, rs1801394 MTRR. В таблице 4 представлена детальная характеристика.

rs1799971(G) аллель в экзоне 1 гена опиоидного μ рецептора OPRM1 вызывает замену аминокислоты в положении 40 аспаргин (Asn) на аспартат (Asp). В литературе полиморфизм известен также как A118G, N40D, или Asn40Asp [3]. Носители хотя бы одного аллеля **rs1799971(G)** имеют большую предрасположенность к алкогольной зависимости, чем носители rs1799971 (A) аллелей, и, таким образом, предполагается,

что более подвержены риску развития алкоголизма [25]. Однако, результаты исследований противоречивы, поддерживая и отвергая данную гипотезу.

Полиморфизм rs1058808 ERBB2 Pro1140Ala ассоциирован с ожирением, полиморфизмам HER-2 как фактор риска развития эндометриального рака у корейских женщин [24]. Полиморфизм rs6265 (Val66Met) является полиморфизмом brain-derived neurotrophic factor BDNF гена. Наиболее распространенный G аллель кодирует Val, в то время как аллель A кодирует Met. Аллель может быть защитным против депрессии, когда подвергается повторному поражению. В двух исследованиях британских женщин, носители rs6265 (A) аллелей были с более низким индексом массы тела ИМТ, чем носители rs6265 (G) аллелей [22].

rs738409 является полиморфизмом в гене PNPLA3 и связан с жировым гепатозом. Показана ассоциация данного полиморфизма с патологическим ожирением - связь PNPLA3 I148M (rs738409) и показателями повреждения печени у лиц европейского происхождения [21].

Таблица 3.

Количество полиморфизмов SNP, найденных среди участников исследования по группам.

	Избыточный вес	Без избыточного веса	Старше > 45 лет	Младше < 45 лет
Wild (Дикий тип)	128	23	41	110
Heterozygous (Гетеризиготный)	109	27	33	103
Mutant (Мутантный)	62	13	16	59

rs1801394, также известный как A66G или Ile22Met, является полиморфизмом в гене MTRR метионинсинтетазы. Этот ген кодирует один из двух ферментов, участвующих в производстве метионина. Белок, кодируемый rs1801394 аллеля имеет низкое сродство к MTR и непоследовательно связан с уровнем гомоцистеина, является фактором риска для развития дефектов нервной трубки и развития синдрома в условиях повышенного гомоцистеина.

Полиморфизм rs1801133 MTHFR и rs1801394 MTRR, одни из шести полиморфизмов метаболических путей риска развития ожирения у подростков европейского происхождения [4]. Ранее нами было показано, что полиморфизм rs1801133 MTHFR, генотип TT C677T является независимым фактором риска сердечно-сосудистых заболеваний и рака молочной железы в казахской популяции [1,2].

Работа выполнена в рамках проекта «Интеграционный геномный и метаболомный анализ кардиометаболических нарушений в казахской популяции» по бюджетной программе МОН РК 3907/ГФ4 «Грантовое финансирование научных исследований» на 2015-2017 гг.

Анализ выборки образцов с различными вариантами выявленных генотипов показал (Рисунок 2), что в четырех полиморфизмах мутантный вариант наблюдался в достаточно

высоком проценте образцов - rs1799971 OPRM1 – 21.2%, rs738409 PNPLA3 – 26.9%, rs1801394 MTRR – 21.2%, rs1058808 ERBB2 – 50%.

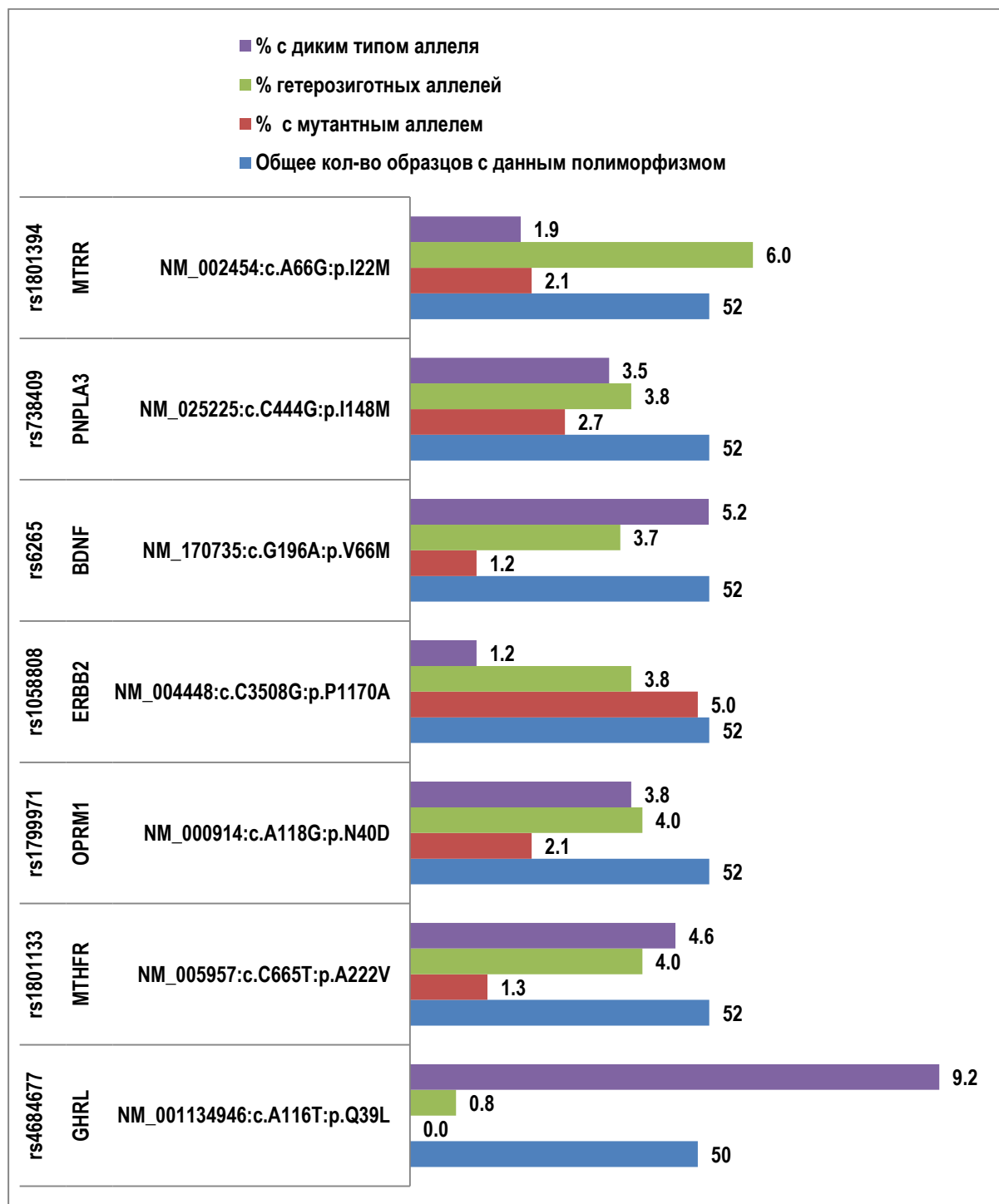


Рисунок – 2. Процентное распределение аллелей между выявленными полиморфизмами.

Работа выполнена в рамках проекта «Интеграционный геномный и метаболомный анализ кардиометаболических нарушений в казахской популяции» по бюджетной программе МОН РК 3907/ГФ4 «Грантовое финансирование научных исследований» на 2015-2017 гг.

В случае полиморфизма rs1058808 ERBB2 дикий немутантный вариант встречался в 11.5%, что указывает на необходимость исследования данного полиморфизма на большей выборке образцов для более глубокого понимания роли данного полиморфизма у индивидуумов казахской национальности.

Изучение и поиск методики по исследованию метаболома у участников исследования.

Был проведен анализ литературы по выбору оптимального метода изучения полного метаболома у участников. В настоящее время основные аналитические инструменты включают ядерную магнитную спектроскопию (ЯМС) и методы, сочетающие различные платформы, такие как газовая хроматография (ГХ) и жидкостная хроматография (ЖХ), объединенных с масс-спектрометрией (МС). Эти подходы имеют свои сильные и слабые стороны, и лучшее решение может быть определено исследовательскими целями. В целом, ГХ в сочетании с МС является хорошо подходящим методом для метаболомного анализа в связи с высокой разделительной мощностью, воспроизводимостью и чувствительностью масс-селективным детектором.

Выводы

Проведена характеристика генетических вариантов, ассоциированных с гипертонией, ожирением и диабетом и проведено сравнение геномных данных 60 образцов с международной базой данных T-HOD (The Text-mined Hypertension, Obesity and Diabetes candidate gene database (T-HOD)).

Были выделены и проанализированы генетические варианты, показавшие ассоциацию с развитием гипертонии, ожирения и диабетом по обоим алгоритмическим предикторам патогенности мутаций PolyPhen2 и SIFT.

Анализ выборки образцов с различными вариантами выявленных генотипов показал, что в четырех полиморфизмах мутантный вариант наблюдался в достаточно высоком проценте образцов - rs1799971 OPRM1 –

21.2%, rs738409 PNPLA3 – 26.9%, rs1801394 MTRR – 21.2%, rs1058808 ERBB2 – 50%.

Первым этапом по изучению ассоциации генетических вариантов и метаболитов, являющихся предикторами ожирения, диабета и атеросклероза у лиц казахской популяции является секвенирование полных экзомов 60 человек казахской национальности. Для этих субъектов, в дальнейшем, мы будем использовать данные анализа метаболома для определения, как кодирующих, так и не кодирующих вариантов, выявленных из нашего геномного анализа, изменяющих уровень метаболитов в клеточной системе. Поскольку метаболиты являются промежуточными биохимическими продуктами, они обеспечивают связь между причинными факторами (геном) и результатом, тем самым расширяя геномику в область функциональной геномики для более глубокого понимания потенциальной патофизиологии и трансляционной медицины.

Интеграционный подход комбинирования геномики и метаболомики позволит значительно улучшить сложные процессы патогенеза данных заболеваний. Данное исследование поможет расширить знания о метаболических нарушениях, повышающих риск кардиометаболических заболеваний у казахов, выявленные метаболиты могут служить в качестве мишени для терапевтического вмешательства. Для практического здравоохранения могут быть предложены новые биомаркеры для диагностики метаболических нарушений, биомаркеры риска развития патологии метаболизма, и последующего развития заболеваний.

У авторов статьи нет конфликта интересов.

Работа выполнена в рамках проекта «Интеграционный геномный и метаболомный анализ кардиометаболических нарушений в казахской популяции» по бюджетной программе МОН РК 3907/ГФ4 «Грантовое финансирование научных исследований» на 2015-2017 гг.

Работа выполнена в рамках проекта «Интеграционный геномный и метаболомный анализ кардиометаболических нарушений в казахской популяции» по бюджетной программе МОН РК 3907/ГФ4 «Грантовое финансирование научных исследований» на 2015-2017 гг.

Таблица 4

Характеристика генетических вариантов, показавших ассоциацию с развитием гипертонии, ожирения и диабетом по обоим алгоритмическим предикторам PP2 и SIFT

Chr	Start	End	Ref	Alt	ID	Func. Ref Gene	Gene. Ref Gene	Exonic Func .refGene	AAChange. refGene	SIFT score	PolyPhen2 score
chr3	10328453	10328453	T	A	rs4684677	exonic	GHRL	Nonsynonymous SNV	NM_001134 946: c.A116T: p.G39L	0,08	0,994
chr1	11856378	11856378	G	A	rs1801133	exonic	MTHFR	Nonsynonymous SNV	NM_005957: c.C665T: p.A222V	0,05	0,987
chr6	1,54E+08	1,54E+08	A	G	rs1799971	exonic	OPRM1	Nonsynonymous SNV	NM_000 914: c.A118G: p.N40D	0,01	0,775
chr17	37884037	37884037	C	G	rs1058808	exonic	ERBB2	Nonsynonymous SNV	NM_004 448: c.C3508G: p.P1170A	0,03	0,607
chr11	27679916	27679916	C	T	rs6265	exonic	BDNF	Nonsynonymous SNV	NM_170 735: c.G196A: p.V66M	0	0,999
chr22	44324727	44324727	C	G	rs738409	exonic	PNPLA3	Nonsynonymous SNV	NM_025 225: c.C444G: p.I148M	0,03	0,944
chr5	7870973	7870973	A	G	rs1801394	exonic	MTRR	Nonsynonymous SNV	NM_002 454: c.A66G: p.I22M	0,02	0,99

Работа выполнена в рамках проекта «Интеграционный геномный и метаболомный анализ кардиометаболических нарушений в казахской популяции» по бюджетной программе МОН РК 3907/ГФ4 «Грантовое финансирование научных исследований» на 2015-2017 гг.

Литература:

- 1 Akilzhanova A., Takamura N., Kusano Y., Karazhanova L., Yamashita S., Saito H., Aoyagi K. Association between C677T/MTHFR genotype and homocysteine concentration in a Kazakh population // *Asia Pac J Clin Nutr.* 2008. V.17(2). P.325-9.
- 2 Akilzhanova A., Nurkina Z., Momynaliev K., Ramanculov E., Zhumadilov Z., Rakhypbekov T., Hayashida N., Nakashima M., Takamura N. Genetic profile and determinants of homocysteine levels in Kazakhstan patients with breast cancer // *Anticancer Res.* 2013 Sep. V.33(9). P.4049-59.
- 3 Berthold H.K., Giannakidou E., Krone W., Tréguët D.A., Gouni-Berthold I. Influence of ghrelin gene polymorphisms on hypertension and atherosclerotic disease. // *Hypertens Res.* 2010 Feb. V.33(2). P.155-160.
- 4 Bokor S., Meirhaeghe A., Ruiz J.R., Zaccaria M., Widhalm K., Gonzalez-Gross M., Amouyel P., Moreno L.A., Molnár D., Dallongeville J. Helena Study Group. Common polymorphisms in six genes of the methyl group metabolism pathway and obesity in European adolescents. // *Int J Pediatr Obes.* 2011 Jun. - V.6(2-2). - P.e336-344.
- 5 Burke G.L., Bertoni A.G., Shea S., Tracy R., Watson K.E., Blumenthal R.S., Chung H., Carnethon M.R. The impact of obesity on cardiovascular disease risk factors and subclinical vascular disease: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis // *Archives of internal medicine.* - 2008. V.168(9). P.928-935.
- 6 Byrne C.D., Wild S.H. The metabolic syndrome. Byrne C.D., Wild S.H., editors. West Sussex, England: John Wiley and Sons; 2005.
- 7 Chrostowska M., Szyndler A., Paczwa P., Narkiewicz K. Impact of abdominal obesity on the frequency of hypertension and cardiovascular disease in Poland - results from the IDEA study (international day for the evaluation of abdominal obesity) // *Blood pressure.* 2011 V.20(3). P.145-152.
- 8 Daviss (April 2005). «Growing pains for metabolomics» *The Scientist* 19 (8). P.25–28
- 9 Fox K.A., Despres J.P., Richard A.J., Brette S., Deanfield J.E., Committee I.S., National C-o. Does abdominal obesity have a similar impact on cardiovascular disease and diabetes? A study of 91,246 ambulant patients in 27 European countries // *European heart journal.* 2009. V.30(24). P.3055-3063.
- 10 Hindorff L.A., Sethupathy P., Junkins H.A., Ramos E.M., Mehta J.P., Collins F.S., Manolio T.A. Potential etiologic and functional implications of genome-wide association loci for human diseases and traits // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009. V.106(23). P.9362-9367.
- 11 Jordan K.W., Nordenstam J., Lauwers G.Y., Rothenberger D.A., Alavi K., Garwood M., Cheng L.L. «Metabolomic characterization of human rectal adenocarcinoma with intact tissue magnetic resonance spectroscopy». // *Diseases of the Colon & Rectum.* 2009. 52(3).-P.520–5.
- 12 Khoury MJ, Adams MJ, Jr., Flanders WD. An epidemiologic approach to ecogenetics. // *Am J Hum Genet.* 1988. V.42(1). P.89-95.
- 13 Lavie C.J., Milani R.V., Ventura H.O. Obesity and cardiovascular disease: risk factor, paradox, and impact of weight loss // *Journal of the American College of Cardiology.* 2009. V.53(21). P.1925-1932.
- 14 Li H., Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform // *Bioinformatics.* 2009. Vol. 25, № 14. P. 1754-1760.
- 15 Li H., Handsaker B., Wysoker A., Fennell T., Ruan J., Homer N., Marth G., Abecasis G., Durbin R. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools // *Bioinformatics.* 2009. Vol. 25, № 16. P. 2078-2079.
- 16 Manolio T.A., Collins F.S., Cox N.J., Goldstein D.B., Hindorff L.A., Hunter D.J., Mc Carthy M.I., Ramos E.M., Cardon L.R., Chakravarti A., Cho J.H., Guttmacher A.E., Kong A., Kruglyak L., Mardis E., Rotimi C.N., Slatkin M., Valle D., Whittemore A.S., Boehnke M., Clark A.G., Eichler E.E., Gibson G., Haines J.L., Mackay T.F., Mc Carroll S.A., Visscher P.M.. Finding the missing heritability of complex diseases // *Nature.* 2009. V.461(7265). P.747-753.
- 17 Mc Kenna A., Hanna M., Banks E., Sivachenko A., Cibulskis K., Kernysky A., Garimella K., Altshuler D., Gabriel S., Daly M., DePristo M.A. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data // *Genome Res.* 2010. Vol. 20, № 9. P. 1297-1303.

Работа выполнена в рамках проекта «Интеграционный геномный и метаболомный анализ кардиометаболических нарушений в казахской популяции» по бюджетной программе МОН РК 3907/ГФ4 «Грантовое финансирование научных исследований» на 2015-2017 гг.

18 Monda K.L., North K.E., Hunt S.C., Rao D.C., Province M.A., Kraja A.T. The genetics of obesity and the metabolic syndrome // *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2010. V.10(2). P. 86-108.

19 Ober C., Vercelli D. Gene-environment interactions in human disease: nuisance or opportunity? // *Trends Genet*. 2011. V.27(3). P.107-115.

20 Ottman R. An epidemiologic approach to gene-environment interaction // *Genet Epidemiol*. 1990. V.7(3). P.177-85.

21 Romeo S., Sentinelli F., Dash S., Yeo G.S., Savage D.B., Leonetti F., Capoccia D., Incani M., Maglio C., Iacovino M., O'Rahilly S., Baroni M.G. Morbid obesity exposes the association between PNPLA3 I148M (rs738409) and indices of hepatic injury in individuals of European descent. // *Int J Obes (Lond)*. 2010 Jan. V.34(1). P.190-194.

22 Shugart Y.Y., Chen L., Day I.N., Lewis S.J., Timpson N.J., Yuan W., Abdollahi M.R., Ring S.M., Ebrahim S., Golding J., Lawlor D.A., Davey-Smith G. Two British women studies replicated the association between the Val66Met polymorphism in the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and BMI // *Eur J Hum Genet*. 2009 Aug. V.17(8). P.1050-1055.

23 Terwilliger J., Lee J.H. Natural experiments in human gene mapping: The

intersection of anthropological genetics and genetic epidemiology. In: Crawford M, editor. *Anthropological Genetics: Theory, Methods, and Applications*. Cambridge: Cambridge University Press; 2007. P. 38-76.

24 Tong S.Y., Ha S.Y., Ki K.D., Lee J.M., Lee S.K., Lee K.B., Kim M.K., Cho C.H., Kwon S.Y. The effects of obesity and HER-2 polymorphisms as risk factors for endometrial cancer in Korean women // *BJOG*. 2009 Jul., V.116(8). P.1046-1052.

25 van den Wildenberg E., Wiers R.W., Dessers J., Janssen R.G., Lambrichts E.H., Smeets H.J., van Breukelen G.J.. A functional polymorphism of the mu-opioid receptor gene (OPRM1) influences cue-induced craving for alcohol in male heavy drinkers // *Alcohol Clin Exp Res*. 2007 Jan. V.31(1). P.1-10.]

26 WHO. Highlights on health in Kazakhstan. 1999.

27 Yan W., Yang X., Zheng Y., Ge D., Zhang Y., Shan Z., Simu H., Sukerobai M., Wang R. The metabolic syndrome in Uygur and Kazak populations // *Diabetes Care*. 2005. V.28(10). P. 2554-5.

28 Zalesin K.C., Franklin B.A., Miller W.M., Peterson E.D., Mc Cullough P.A. Impact of obesity on cardiovascular disease // *The Medical clinics of North America*. 2011. V.95(5). P.919-937.

Контактная информация:

Акилжанова Айнура Рахметуловна - д.м.н., PhD, ассоциированный профессор, руководитель Лаборатории геномной и персонализированной медицины, ЧУ «National Laboratory Astana», Назарбаев университет.

Почтовый адрес: проспект Кабанбай батыра, 53, кабинет 9519В, 010000, г. Астана

E-mail: akilzhanova@nu.edu.kz

Телефон: +7 7172 70 65 01