

ТАРГЕТНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ ГЕНА *LEP* В РАЗЛИЧНЫХ ЭТНИЧЕСКИХ ГРУППАХ ПОДРОСТКОВ С ОЖИРЕНИЕМ

© 2024 г. Е. В. Беляева^{1, *}, Т. А. Баирова¹, О. А. Ершова¹, А. Ю. Самбялова¹, В. В. Синьков¹, В. В. Бальжиева¹, Л. В. Рычкова¹, Л. И. Колесникова¹

¹Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, Иркутск, 664003 Россия

*e-mail: belyeva_irk@mail.ru

Поступила в редакцию 22.04.2024 г.

После доработки 28.06.2024 г.

Принята к публикации 02.07.2024 г.

Ген, кодирующий лептин (*LEP*), иначе называют геном фактора ожирения. Показано, что полиморфные локусы и мутации в гене *LEP* могут вызывать нарушения обмена веществ и приводить к ожирению, а также развитию различных патологий, связанных с ожирением. Цель данного исследования — провести поиск полиморфных вариантов гена *LEP* в группах подростков с избыточной массой тела и/или ожирением в этнических выборках русских и бурят. В исследовании приняли участие 48 подростков от 11 до 17 лет (средний возраст $14,27 \pm 2,09$ лет) с разным статусом веса: нормальной массой тела и избыточной массой тела и/или ожирением. Из них русских — 21, бурят — 27. Методы исследования включали: оценку клинического статуса и антропометрических показателей; полимеразную цепную реакцию (ПЦР) и секвенирование по методу Сэнгера фрагмента гена *LEP*; биоинформационный анализ; статистическую обработку полученных результатов. В исследовании были подобраны условия амплификации для фрагмента гена *LEP* общей протяженностью 3878 п. н. (128251456–128255334) и проведено его секвенирование. После биоинформатической обработки полученных результатов в исследованной группе подростков с разным статусом веса обнаружено десять SNP. Из них семь зарегистрированных в базе NCBI и три замены, ранее не зарегистрированных в NCBI. Из семи полиморфизмов, зарегистрированных в NCBI, два SNP идентифицированы во всех группах исследования, два SNP выявлены в основной группе, из них один в группе русских, один в группе бурят, а также три SNP обнаружены только в контрольной группе у подростков бурят. Три SNP, не зарегистрированные в NCBI, были идентифицированы только в группе подростков с избыточной массой тела и/или ожирением, в том числе два в группе русских — chr7:128255051 (*G>C*), chr7:128255092 (*G>C*), и один в группе бурят — chr7:128254681 (*C>G*). В исследовании охарактеризована частота SNP, идентифицированных в результате секвенирования фрагмента гена *LEP* в группах подростков с разным статусом веса.

Ключевые слова: ген лептина, секвенирование, избыточная масса тела, ожирение, подростки.

DOI: 10.31857/S0016675824110063 **EDN:** WBGYW

Урбанизация и изменение образа жизни внесли вклад в стремительный рост числа случаев детского ожирения и избыточной массы тела [1]. Это может быть связано с несколькими факторами, включая неоптимальные методы вскармливания детей первого года жизни, растущую доступность ультраобработанных пищевых продуктов в мировых продовольственных запасах и изменения в рационе детей [2, 3]. Ожирение — сложное многофакторное заболевание, связанное с генетическими факторами и факторами окружающей среды. Кроме этого, реакция организма на диету и физическую активность при лечении ожирения также генетически детерминированы [4]. Развитие

методов полногеномного поиска ассоциаций (GWAS) и секвенирования следующего поколения (NGS) способствовало открытию генетических полиморфизмов, ассоциированных с ожирением. Формирование моногенного ожирения связывают по меньшей мере с пятью генами: лептина (*LEP*), рецептора лептина (*LEPR*), рецептора меланокортина 4 (*MC4R*), прогормонконвертазы 1 (*PCSK1*) и проопиомеланокортина (*POMC*) [5].

Наиболее изученным из этих генов является ген *LEP*, его часто называют геном фактора ожирения, так как лептин играет важную роль в регуляции энергетического гомеостаза, в росте плода, провоспалительных иммунных реакциях, ангиогенезе

и липолизе, также регулирует потребление пищи, массу тела и репродуктивную функцию [6]. Лептин секретируется белыми адипоцитами в кровоток, связывается с рецептором лептина в головном мозге, который активирует нижестоящие сигнальные пути, подавляя чувство голода и способствуя расходованию энергии. Ген *LEP* локализован на длинном плече хромосомы 7 (7q32.1), состоит из трех экзонов и двух интронов, кодируемый геном *LEP* белок имеет массу 16кДа и состоит из 167 аминокислот [7].

Для гена *LEP* в базе Национального центра биотехнологической информации США NCBI зарегистрировано 700 SNP [8]. В ClinVar — базе данных о клинической значимости генетических маркеров, ассоциация полиморфизмов гена *LEP* с клиническими фенотипами (заболеваниями) показана для 139 полиморфизмов, из которых 29 определены как патогенные, еще 2 — как вероятно патогенные [9]. По данным ClinVar, ассоциация с ожирением из-за врожденного дефицита лептина показана для пяти полиморфизмов, с дисфункцией лептина для одного полиморфизма.

Исследования по поиску ассоциаций полиморфных вариантов генов энергетического обмена с ожирением и метаболическим синдромом, как правило, проводятся у взрослых [10–12]. В исследованиях у подростков было показано, что полиморфизм гена рецептора лептина *LEPR* и гена рецептора меланокортина 4 *MC4R* связаны с риском развития метаболических нарушений у подростков-европеоидов с избыточной массой тела и ожирением, в то время как у подростков азиатского происхождения с этой патологией ассоциирован полиморфизм гена *FTO* [13]. В другой работе было установлено, что локус rs2167270 гена *LEP* ассоциирован с пищевым поведением у подростков, статистически значимые различия были установлены при анализе показателей пищевого поведения по шкале «Когнитивная сдержанность» опросника TFEQ [14]. Эти результаты согласуются с более ранним исследованием, в котором также была показана ассоциация полиморфных вариантов гена *LEP* с пищевым поведением у чилийских детей по шкалам «Эмоциональное питание» и «Неконтролируемое питание» опросника TFEQ [15].

Таким образом, в исследованиях у подростков была показана ассоциация гена *LEP* с пищевым поведением, в то время как вклад этого гена в развитие детского и подросткового ожирения не установлен. Цель настоящего исследования — провести поиск полиморфных вариантов гена *LEP* в группах подростков с избыточной массой тела и/или ожирением в этнических выборках русских и бурят.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проведено на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», на территории Республики Бурятия и Иркутской области. Набор пациентов в группы исследования проводился в Клинике ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ (г. Иркутск) и Детской республиканской клинической больницы (г. Улан-Удэ). Из группы 354 подростков, набранной в ходе диспансерного осмотра, описанной нами ранее [16], для данного исследования случайным образом были отобраны 48 подростков от 11 до 17 лет (средний возраст $14,27 \pm 2,09$ лет) с разным статусом веса, из них 21 русский и 27 бурят. Основная группа данного исследования включала 29 подростков с избыточной массой тела и/или ожирением ($\text{SDS ИМТ} > 1$), из них 14 русских и 15 бурят; контрольная группа включала 19 подростков с нормальной массой тела ($\text{SDS ИМТ} < 1$), из них 7 русских и 12 бурят. Сравниваемые группы сопоставимы по полу ($\chi^2 = 1.3067$, $d.f. = 1$, $p = 0.253$) и возрасту ($W = 335$, $p = 0.2078$) и имеют статистически значимые отличия по антропометрическим показателям: весу ($W = 45.5$, $p < 0.001$), индексу массы тела (**ИМТ**) ($W = 0$, $p < 0.001$), SDS ИМТ ($W = 0$, $p < 0.001$).

Принадлежность к этнической группе устанавливали на основе опроса обследуемых об этнической принадлежности родственников I–III степени родства. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» (протокол заседания № 6 от 02.12.2015 г.) и соответствует этическим принципам Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (Бразилия, 2013 г.). В работе с подростками руководствовались ст. 24 «Права несовершеннолетних» «Основ законодательства Российской Федерации об охране здоровья граждан» от 22.07.1993 № 5487-1 (с изменениями от 20.12.1999).

Антропометрическое обследование подростков включало измерение роста и веса. Рост и вес оценивались по перцентильным таблицам для данного пола и возраста с последующим расчетом индекса массы тела (ИМТ) как отношения массы тела в килограммах к квадрату роста человека, выраженному в метрах, и коэффициента стандартного отклонения (SDS ИМТ) с помощью компьютерной программы Auxology 1.0 b17 (Pfizer, США). Масса тела классифицировалась как избыточная в случаях значения SDS ИМТ от 1 до 2, ожирение диагностировали при $\text{SDS ИМТ} > 2$.

Молекулярно-генетическое исследование полиморфных локусов гена *LEP* проводили с помощью метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующей электрофоретической детекцией и

секвенирования по методу Сэнгера. Экстракцию геномной ДНК проводили из цельной венозной крови, забранной в вакуумную пробирку объемом 4.0 мл с КЗ ЭДТА с использованием коммерческих наборов «ДНК Сорб-Б» (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия) согласно инструкции производителя.

С использованием программы Primer-BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) были подобраны 36 олигонуклеотидов (18 пар), которые полностью перекрывают последовательность гена *LEP*. В настоящем исследовании представлены результаты работы с четырьмя парами праймеров. Олигонуклеотиды были синтезированы в ЗАО «Евроген», их характеристика приведена в табл. 1.

Для каждой пары праймеров проводили подбор оптимальных условий амплификации: температуру отжига праймеров, количественное соотношение компонентов реакционной смеси для амплификации, программу амплификации (варьирование температурных полок, времени инкубации и количества циклов). Для подбора температуры отжига праймеров использовали следующую формулу: $T = 2(AT) + 4(GC)$ (инструкция к набору реагентов ScreenMix), где T – температура отжига праймеров; AT – количество нуклеотидов аденин и тимин; GC – количество нуклеотидов гуанин и цитозин, входящих в праймер. Также для подбора температуры

отжига праймеров использовали онлайн-калькулятор на сайте компании Thermo Fisher (<https://www.thermofisher.com>). Для каждой пары праймеров ставили не менее трех экспериментальных установок ПЦР, варьируя температуру отжига. Амплификацию фрагментов гена *LEP* проводили на амплификаторе нуклеиновых кислот «ДТ-Прайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) с использованием готовой смеси для ПЦР Screen Mix (ЗАО «Евроген»). Компоненты ПЦР смешивали в последовательности и объемах, приведенных в табл. 2, амплификацию проводили по программе, приведенной в табл. 3, согласно протоколу производителя набора реагентов.

Детекцию продуктов амплификации осуществляли в 1.5%-ном агарозном геле, окрашенном бромистым этидием. Продукты ПЦР вырезали из геля и очищали с помощью спин-колонок. Далее проводили секвенирование продуктов ПЦР на автоматическом секвенаторе «НАНОФОР 05» (ООО «Синтол», Россия) с использованием наборов реагентов BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, США), работа с которыми проводилась в соответствии с инструкцией производителя. Результаты секвенирования проходили биоинформационную обработку, которая включала оценку качества хроматограмм и выравнивание полученных нуклеотидных последовательностей на

Таблица 1. Характеристика олигонуклеотидов

Название	Структура	Длина (абсолютное кол-во нуклеотидов)	Молекулярный вес (M_w) г/моль
s14_L867	CCAGACACTGGCAGTCTACC	20	6028
s14_R867	AAACTGCACTCCAGGGAGAC	20	6101
s15_L880	GGAAAAGCTGACTGGGAGGG	20	6277
s15_R880	TGGATAAGGGGTGTCCATGC	20	6194
s17_L857	CGATTAGCTGAGCCACATGC	20	6083
s17_R857	GGGCTCCCGTGATATTGTGT	20	6136
s18_L910	TGGGTGAGTAGCATAATCGCT	21	6481
s18_R910	GGAATCTCAGCAGGCAGAGG	20	6197

Таблица 2. Последовательность внесения и объемы компонентов ПЦР-смеси

Компонент	Кол-во, мкл на один образец ДНК
Стерильная вода	5.2
Screen Mix	2.0
ПЦР-праймер 1 (L-левый)	0.4
ПЦР-праймер 2 (R-правый)	0.4
ДНК-матрица	2.0
Общий объем ПЦР-смеси	10.0

Таблица 3. Программа амплификации

Стадия		Температура, °С	Время инкубации	Количество циклов
1	Предварительная денатурация	95	5 мин	1
2	Денатурация:	95	30 с	40
	– отжиг праймеров	52–70	30 с	
	– элонгация	72	30 с	
3	Хранение	4		

референсную гена *LEP* NG_007450.1 RefSeqGene в программе Unipro UGENE.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы RStudio, которая находится в свободном доступе. Для описания количественных признаков использовали следующие показатели описательной статистики: для показателя «возраст» применяли среднее арифметическое (*M*) и стандартное отклонение (*sd*); для антропометрических показателей — медиану с размахом в виде первого и третьего квартилей [*Me* (*Q1*; *Q3*)]. При анализе различий между группами по антропометрическим признакам использовали непараметрический критерий Манна–Уитни (*W*). Нулевую гипотезу об отсутствии статистически значимых отличий отклоняли при уровне значимости 5%.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Проведение исследования было разделено на два этапа. На первом проводился подбор условий амплификации фрагмента гена *LEP*. На втором этапе с образцами ДНК основной и контрольной групп последовательно проводили ПЦР, секвенирование по Сэнгеру и идентификацию SNP. Подбор оптимальных условий амплификации проводили последовательно для каждой пары праймеров с использованием пяти случайно выбранных образцов ДНК.

Подбор условий ПЦР для 14-й пары праймеров (олигонуклеотиды: s14_L867 s14_R867) был начат с температуры отжига. Согласно формуле для подбора температуры отжига праймеров (инструкция к набору реагентов ScreenMix) температура для левого праймера (s14_L867) составила 64°С, для правого (s14_R867) — 62°С. Температура отжига для этой пары праймеров, вычисленная с помощью онлайн-калькулятора на сайте компании Thermo Fisher, составила 64.9°С. Для первого этапа эксперимента по подбору оптимальных условий амплификации провели три постановки ПЦР с температурой отжига праймеров: 58, 60 и 62°С. Ожидаемый результат эксперимента — получить ампликоны размером 867 пн с минимальным количеством побочных и неспецифичных продуктов

амплификации. После серии экспериментов по варьированию температуры отжига праймеров и снижению концентрации праймеров в амплификационной смеси оптимальные условия были подобраны: температура отжига 60°С, уменьшение количества праймеров в ПЦР смеси на 20% от исходного (0,32 мкл).

Подбор условий ПЦР для 15-й пары праймеров (олигонуклеотиды: s15_L880, s15_R880), как и для 14-й пары праймеров, был начат с температуры отжига. Согласно формуле для подбора температуры отжига праймеров температура для левого праймера (s15_L880) составила 64°С, для правого (s15_R880) — 62°С. Температура отжига для этой пары праймеров, вычисленная с помощью онлайн-калькулятора на сайте компании Thermo Fisher составила 64.9°С. Для первого этапа эксперимента по подбору оптимальных условий амплификации осуществили три постановки ПЦР-реакции с температурой отжига праймеров: 58, 60 и 62°С. Ожидаемый результат эксперимента — получить ампликоны размером 880 пн с минимальным количеством димеров праймеров и продуктов неспецифичной амплификации. После серии экспериментов по варьированию температуры отжига праймеров, снижению концентрации праймеров и ДНК-матрицы в амплификационной смеси, изменения времени элонгации в программе амплификации оптимальные условия были подобраны: температура отжига 63°С, уменьшение количества праймеров в ПЦР смеси на 20% (0,32 мкл), увеличение количества ДНК в ПЦР смеси на 50% (3 мкл), увеличение времени элонгации в ПЦР программе в 3 раза (90 с).

Подбор условий ПЦР для 17-й пары праймеров (олигонуклеотиды: s17_L857, s17_R857) традиционно был начат с температуры отжига. Согласно формуле для подбора температуры отжига праймеров температура для левого праймера (s17_L857) составила 62°С, для правого (s17_R857) также 62°С. Температура отжига для этой пары праймеров, вычисленная с помощью онлайн-калькулятора на сайте компании Thermo Fisher, составила 64.3°С. Для первого этапа эксперимента по подбору оптимальных условий амплификации поставили три ПЦР с температурой отжига праймеров: 56, 58 и

60°С. Ожидаемый результат эксперимента — получить ампликоны размером 857 пн с минимальным количеством димеров праймеров и продуктов неспецифичной амплификации. После серии экспериментов по варьированию температуры отжига праймеров, снижению концентрации праймеров в амплификационной смеси, изменению времени элонгации в программе амплификации оптимальные условия были подобраны: температура отжига 64°С, уменьшение количества праймеров в ПЦР смеси на 10% от исходного (0,36 мкл), время элонгации 1 с, стандартное количество циклов 45, время первичной денатурации ДНК 3 мин.

Подбор условий ПЦР для 18-й пары праймеров (олигонуклеотиды: s18_L910, s18_R910), как и для других праймеров, был начат с температуры отжига. Согласно формуле для подбора температуры отжига праймеров температура для левого праймера (s18_L910) составила 62°С, для правого (s18_R910) — 64°С. Онлайн-калькулятор на сайте Thermo Fisher вычислил температуру отжига для этой пары праймеров — 64,2°С. Для первого этапа эксперимента по подбору оптимальных условий амплификации поставили три ПЦР с температурой отжига праймеров: 57, 59 и 61°С. Ожидаемый результат эксперимента — получить ампликоны размером 910 п. н. с минимальным количеством димеров праймеров и продуктов неспецифичной амплификации. После серии экспериментов по варьированию температуры отжига праймеров, снижению концентрации праймеров в амплификационной смеси, изменению времени элонгации и количества циклов в программе амплификации оптимальные условия были подобраны: температура отжига 64°С, уменьшение количества праймеров в ПЦР смеси на 10% от исходного (0,36 мкл), время

элонгации 1 с, количество циклов ПЦР — 40, время первичной денатурации ДНК 3 мин.

Краткое описание подобранных условий ПЦР для пяти праймеров гена *LEP* представлено в табл. 4.

На втором этапе исследования, после того как оптимальные условия для амплификации были подобраны, проведено секвенирование фрагмента гена *LEP*. После выравнивания полученных результатов на референсную последовательность и биоинформационной обработки полученных данных нами идентифицировано 10 однонуклеотидных замен, из них семь зарегистрированы в базе NCBI и три замены не зарегистрированы в NCBI. Характеристика выявленных SNP приведена в табл. 5 и 6.

Из семи полиморфизмов, зарегистрированных в NCBI, два SNP rs7788818, получится (rs3828942; rs7788818) идентифицированы во всех группах исследования, два 3 SNP выявлено только в основной группе, из них один — в группе русских (rs28954118), один — в группе бурят (rs759854910), а также три SNP обнаружены только в контрольной группе у подростков бурят (rs144755411, rs199893150, rs917105894). Так, альтернативный *A*-аллель полиморфизма rs3828942 был выявлен во всех группах исследования, его частота оказалась выше частоты референсного аллеля. В основной группе частота *A*-аллеля rs3828942 составила 50 и 77% у русских и бурят соответственно, в группе контроля — 70 и 89% у русских и бурят соответственно. *G*-аллель rs7788818 также был идентифицирован во всех группах исследования, его частота оказалась выше частоты референсного аллеля. *T*-аллель rs28954118 идентифицирован только у русских подростков

Таблица 4. Оптимальные условия ПЦР пяти фрагментов гена *LEP*

Варьируемые условия	Название и длина фрагмента				
	S14, 867 пн	S15, 880 пн	S16, 891 пн*	S17, 857 пн	S18, 910 пн
Количество праймеров	–20% 0.32 мкл	Стандартно 0.4 мкл	–10% 0.36 мкл	Стандартно 0.4 мкл	–10% 0.36 мкл
Количество ДНК-матрицы	Стандартно 2 мкл	Увеличено 3 мкл	Стандартно 2 мкл	Стандартно 2 мкл	Стандартно 2 мкл
Температура отжига праймеров, °С	60	63	60	64	64
Время элонгации в программе амплификации, с	Стандартно 30	Увеличено 90	Стандартно 30	Снижено 1	Снижено 1
Количество циклов ПЦР-программы	Стандартно 40	Стандартно 40	Стандартно 40	Увеличено 45	Стандартно 40

Примечание. * — подбор условий для фрагмента S16 размером 891 п. н. описан нами ранее [17].

Таблица 5. Характеристика идентифицированных SNP, зарегистрированных в NCBI, и частота альтернативного аллеля в группах исследования

№	Идентификатор db SNP	Изменения нуклеотидов	Частота альтернативного аллеля				
			символ аллеля	основная группа		контрольная группа	
				русские <i>n</i> = 14	буряты <i>n</i> = 15	русские <i>n</i> = 7	буряты <i>n</i> = 12
1	rs3828942*	g.17975G>A	A	0.5	0.77	0.7	0.89
2	rs28954118*	g.18852A>T	T	0.107	—	—	—
3	rs759854910*	g.18478G>C	C	—	0.033	—	—
4	rs7788818	g.17554A>G	G	0.961	0.964	1	1
5	rs144755411	g.17737C>T	T	—	—	—	0.182
6	rs199893150	g.18683C>T	T	—	—	—	0.05
7	rs917105894	g.17282G>T	T	—	—	—	0.056

Примечание. * – зарегистрировано в Clin.Var.

Таблица 6. Характеристика SNP, идентифицированных в группах исследования и не зарегистрированных в базе NCBI

№	Идентификатор	Позиция в гене	Изменения нуклеотидов
1	#18774	chr7:128255051	G > C
2	#18815	chr7:128255092	G > C
3	#18404	chr7:128254681	C > G

основной группы, его частота составила 10%, в то время как C-аллель rs759854910 с частотой 3% обнаружен у подростков бурят основной группы. В контрольной группе идентифицировано три SNP, которые выявлены у подростков бурят. Частота T-аллеля rs144755411 составила 18%, частоты альтернативных аллелей rs199893150 и rs917105894 совпадают и соответствуют 5%.

Три SNP, идентифицированные нами в гене *LEP* и не зарегистрированные в базе NCBI, обнаружены только в группе подростков с избыточной массой тела и ожирением. Каждая из замен была выявлена по одному разу, в том числе две замены в группе русских и одна в группе бурят.

ОБСУЖДЕНИЕ

В современном динамично развивающемся мире усиливается влияние процессов глобализации, миграции и урбанизации населения, которые влияют на изменение традиционного рациона [18]. Эти изменения сопровождаются метаболическими нарушениями, которые в свою очередь могут приводить к ожирению. Полиморфизм генов, вовлеченных в механизм контроля массы тела и аппетита, может повышать риск нарушений регуляции

пищевого поведения, в том числе у детей, и приводить к развитию экзогенно-конституционального ожирения [19]. В связи с этим поиск полиморфных локусов генов, ассоциированных с данным патологическим состоянием, является перспективным направлением научных исследований, так как может быть использован для оптимизации подходов к ранней профилактике заболеваний и при формировании групп риска.

В рамках решения цели настоящего исследования были подобраны условия для проведения амплификации фрагмента гена *LEP* протяженностью 3878 п. н. и проведено секвенирование этого участка гена. В изученном фрагменте гена *LEP* нами было выявлено 10 SNP, из них три не зарегистрированы и семь зарегистрированы в базе NCBI, из которых для трех полиморфизмов в базе данных ClinVar показана связь с клиническими фенотипами. Наиболее изученным из этих трех полиморфизмов является rs3828942, для которого в поисковой системе PubMed на апрель 2024 г. имеется 15 публикаций [20], в пяти из которых показана связь этого полиморфизма с заболеваниями [21]. В исследованиях показана ассоциация полиморфизма rs3828942 с более высоким ИМТ у подростков с ожирением [22], формированием метаболического

синдрома у пациентов с шизофренией, принимающих нейролептики [23, 24], возникновением тревожных расстройств у женщин [25] и плохим качеством сна у больных СПИД/ВИЧ [26].

Частота альтернативного *A*-аллеля rs3828942 в среднем в мировой популяции ($n = 40646$), по данным NSBI, составляет 0.41, в европейской популяции ($n = 33072$) — 0.44, в азиатской ($n = 128$) — 0.76. Данные о более высокой частоте *A*-аллеля rs3828942 у жителей Азии (по сравнению с европейцами) согласуются с результатами нашего исследования. Так, в группах русских подростков основной и контрольной групп его частота составила 50 и 70% соответственно, в то время как у подростков бурят основной и контрольной групп — 77 и 89% соответственно.

Два других полиморфизма (rs28954118 и rs759854910) изучены меньше, по ним отсутствуют публикации в PubMed, клиническая значимость в ClinVar оценена как неопределенная. По данным NCBI, частота альтернативного *T*-аллеля rs28954118 в среднем в мировой популяции ($n = 21484$) составляет 0.023, в европейской популяции ($n = 16894$) — 0.028, у азиат ($n = 114$) *T*-аллель не обнаружен. Эти данные также согласуются с результатами нашего исследования, *T*-аллель rs28954118 с частотой 10% обнаружен в группе русских подростков основной группы, среди подростков бурят *T*-аллель не идентифицирован. Частота альтернативного *C*-аллеля rs759854910 в среднем в мировой популяции ($n = 18532$) очень низкая и составляет 0.00005, в европейской популяции ($n = 13348$) — 0.00007, в азиатской популяции ($n = 112$) *C*-аллель не обнаружен. В нашем исследовании *C*-аллель rs759854910 был обнаружен только у подростков бурят основной группы с частотой 3% и не был идентифицирован у русских подростков.

Таким образом, секвенирование фрагмента гена *LEP* в выборке подростков с избыточной массой тела и ожирением позволило идентифицировать 10 SNP, семь из которых зарегистрированы в NSBI, а три не зарегистрированы. В настоящем исследовании впервые в мире идентифицированы полиморфные варианты гена лептина у подростков с избыточной массой тела и ожирением: у русских — chr7:128255051 (*G*>*C*), chr7:128255092 (*G*>*C*), у бурят — chr7:128254681 (*C*>*G*). Из семи SNP, идентифицированных в группах исследования и зарегистрированных в NSBI, только для одного (rs3828942) в PubMed имеются публикации, демонстрирующие связь этого полиморфизма с клиническими фенотипами. Данные о клинической значимости других SNP, идентифицированных нами, недостаточны. Поэтому поиск ассоциации выявленных нами SNP с ожирением у подростков двух этнических групп является актуальным и станет темой наших дальнейших исследований.

Данная работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Центр разработки прогрессивных персонализированных технологий здоровья» ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ, г. Иркутск.

Работа выполнена в рамках госбюджетной темы «Ключевые закономерности и механизмы формирования нарушений здоровья детей и подростков как основа персонализированного подхода к диагностике, лечению и профилактике в современной педиатрии» (шифр темы 0416-2021-001, регистрационный номер в ЕГИСУ №121022500178-3).

Исследование одобрено Этическим комитетом ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» 02.12.2015 г., протокол заседания № 6.

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие: в случае, если возраст обследуемого меньше 14 лет, информированное добровольное согласие получено от родителей, если возраст обследуемого 14 лет и больше — от самого обследуемого.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Agrahari M. K., Mallik M., Sapkota K. et al. Abnormal high body mass index among adolescents of secondary schools // JNMA: J. Nepal Med. Ass. 2024. V. 62. № 269. P. 34–36. DOI:10.31729/jnma.8405
2. Белькова Н. Л., Немченко У. М., Погодина А. В. и др. Особенности состава и структуры кишечного микробиома подростков с ожирением и разной продолжительностью грудного вскармливания // Бюл. эксперим. биол. и мед. 2019. Т. 167. № 6. С. 717–721. DOI:10.1007/s10517-019-04617-7
3. Neri D., Martínez Steele E., Rauber F. et al. Infants' dietary pattern characterized by ultraprocessed foods is associated with rapid weight gain and overweight/obesity risk: national health and nutrition examination survey 2009–2018 // J. Acad. of Nutrition and Dietetics. 2024. V. 24. P. 2212–2672. DOI:10.1016/j.jand.2024.02.003
4. Егорова Э. С., Ахметов И. И. Генетические полиморфизмы, ассоциированные с эффективностью коррекции массы тела: систематический обзор // Генетика. 2023. Т. 59. № 8. С. 870–887. DOI:10.31857/S0016675823080052

5. Nordang G. B. N., Busk O. L., Tveten K. Next-generation sequencing of the monogenic obesity genes *LEP*, *LEPR*, *MC4R*, *PCSK1* and *POMC* in a Norwegian cohort of patients with morbid obesity and normal weight controls // *Mol. Genet. and Metabolism*. 2017. V. 121. № 1. P. 51–56. DOI:10.1016/j.ymgme.2017.03.007
6. Obradovic M., Sudar-Milovanovic E., Soskic S. et al. Leptin and obesity: Role and clinical implication. // *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021. V. 12. P. 585887. DOI:10.3389/fendo.2021.585887
7. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3952> (дата обращения 10.04.2024).
8. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?LinkName=gene_snp&from_uid=3952 (дата обращения 10.04.2024).
9. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar> (дата обращения 10.04.2024).
10. Кочетова О. В., Викторова Т. В., Мустафина О. Е. и др. Ассоциации полиморфных вариантов генов *ADRA2A* и *ADRB3* с метаболическим синдромом у татар // *Генетика*. 2015. Т. 51. №7. С. 830. DOI: 10.7868/S0016675815070061
11. Трифонова Е. А., Попович А. А., Вагайцева К. В. и др. Метод мультиплексного генотипирования полиморфных вариантов генов, ассоциированных с ожирением и индексом массы тела // *Генетика*. 2019. Т. 55. № 10. С. 1218–1230. DOI:10.1134/S001667581910014X
12. Raskiliene A., Smalinskiene A., Kriaucioniene V. et al. Associations of *MC4R*, *LEP*, and *LEPR* polymorphisms with obesity-related parameters in childhood and adulthood // *Genes (Basel)*. 2021. V. 12. № 6. DOI:10.3390/genes12060949
13. Иевлева К. Д., Баирова Т. А., Шенеман Е. А. и др. Вклад носительства полиморфных локусов генов энергетического обмена в метаболические нарушения у подростков двух этнических групп с избыточной массой тела // *Бюл. эксперим. биол. и мед.* 2021. Т. 172. № 10. С. 440–444. DOI:10.47056/0365-9615-2021-172-10-440-444
14. Кочетова О. В., Шангареева З. А., Викторова Т. В. и др. Ассоциация вариантов генов *LEP* rs2167270, *LEPR* rs1137100, *GHRL* rs696217, rs27647 и *NPY* rs16147 с ожирением и пищевым поведением подростков: исследование «случай–контроль» // *Вопросы современной педиатрии*. 2022. Т. 21. № 3. С. 242–252. DOI:10.15690/vsp.v21i3.2428
15. Valladares M., Obregón A. M., Weisstaub G. et al. Association between feeding behavior, and genetic polymorphism of leptin and its receptor in obese Chilean children // *Nutricion Hospitalaria*. 2015. V. 31. № 3. P. 1044–1051. DOI:10.3305/nh.2015.31.3.8049
16. Баирова Т. А., Бальжиева В. В., Аюрова Ж. Г. и др. Соотношение талии к росту – важный антропометрический дискриминатор метаболических нарушений у подростков с избыточной массой тела и ожирением: пилотное исследование // *Педиатрия. Журн. им. Г.Н. Сперанского*. 2022. Т. 101. № 5. С. 32–42. DOI:10.24110/0031-403X-2022-101-5-32-42
17. Баирова Т. А., Ершова О. А., Самбялова А. Ю. и др. Секвенирование фрагмента гена лептина у подростков с разным статусом веса // *Acta Biomedica Scientifica*. 2023. Т. 8. № 4. С. 92–100. DOI:10.29413/ABS.2023-8.4.10
18. Новикова Е. А., Рычкова Л. В., Погодина А. В. и др. Ожирение у подростков, рожденных путем кесарева сечения. Вопросы детской диетологии. 2021. Т. 19. № 6. С. 26–33. DOI:10.20953/1727-5784-2021-6-26-33
19. Бочарова О. В., Теплякова Е. Д. Ожирение у детей и подростков — проблема здравоохранения XXI в. // *Казанский мед. журн.* 2020. Т. 101. № 3. С. 381–388. DOI:10.17816/KMJ2020-381
20. Labayen I., Ruiz J. R., Moreno L. A. et al. The effect of ponderal index at birth on the relationships between common *LEP* and *LEPR* polymorphisms and adiposity in adolescents // *Obesity (Silver Spring, Md.)*. 2011. V. 19. № 10. P. 2038–2045. DOI:10.1038/oby.2011.74
21. Brandl E. J., Frydrychowicz C., Tiwari A. K. et al. Association study of polymorphisms in leptin and leptin receptor genes with antipsychotic-induced body weight gain // *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. 2012. V. 38. № 2. P. 134–141. DOI:10.1016/j.pnpbp.2012.03.001
22. Boiko A. S., Pozhidaev I. V., Paderina, D. Z. et al. Gene polymorphisms of hormonal regulators of metabolism in patients with schizophrenia with metabolic syndrome // *Genes*. 2022. V. 13. № 5. DOI:10.3390/genes13050844
23. Salerno P. S. V., Bastos C. R., Peres A. et al. Leptin polymorphism rs3828942: Risk for anxiety disorders? // *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*. 2021. V. 271. P. 1141–1148. DOI:10.1007/s00406-019-01051-8
24. Aouizerat B. E., Byun E., Pullinger C. R. et al. Sleep disruption and duration are associated with variants in genes involved in energy homeostasis in adults with HIV/AIDS // *Sleep Medicine*. 2021. V. 82. P. 84–95. DOI:10.1016/j.sleep.2020.08.028

Targeted Sequencing of the *LEP* Gene in Various Ethnic Groups of Obese Adolescents

E. V. Belyaeva^{1, *}, T. A. Bairova¹, O. A. Ershova¹, A. Yu. Sambyalova¹,
V. V. Sinkov¹, V. V. Balzhieva¹, L. V. Rychkova¹, L. I. Kolesnikova¹

¹Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, 664003 Russia

*e-mail: belyeva_irk@mail.ru

The gene encoding leptin (*LEP*) is otherwise called the obesity factor gene. It has been shown that polymorphic loci and mutations in the *LEP* gene can cause metabolic disorders and lead to obesity, as well as the development of various pathologies associated with obesity. The purpose of this study was to search for polymorphic variants of the *LEP* gene in groups of overweight and/or obese adolescents in ethnic samples of Russians and Buryats. The study involved 48 adolescents aged 11 to 17 years (average age 14.27 ± 2.09 years) with different weight status: normal body weight and overweight and/or obesity. Of these, 21 were Russians and 27 were Buryats. The research methods included: assessment of the clinical status and anthropometric indicators; polymerase chain reaction (PCR) and sequencing using the Sanger method of a fragment of the *LEP* gene; bioinformatic analysis; statistical processing of the results obtained. In the study, amplification conditions were selected for a fragment of the *LEP* gene with a total length of 3878 bp. (128251456–128255334) and its sequencing was carried out. After bioinformatic processing of the obtained results, ten SNPs were found in the studied group of adolescents with different weight status, seven of them registered in the NCBI database and three replacements not previously registered in the NCBI. Of the seven polymorphisms registered in the NCBI, one SNP was identified in all study groups, three SNPs were identified in the main group, one of them in the Russian group, one in the Buryat group and one in both ethnic groups, and three SNPs were found only in the control group in Buryat adolescents. Three SNPs not registered with the NCBI were identified only in the overweight and/or obese adolescents group, including two in the Russian group chr7:128255051 ($G > C$), chr7:128255092 ($G > C$) and one in the Buryat group chr7:128254681 ($C > G$). The study characterized the frequency of SNPs identified as a result of sequencing of a fragment of the *LEP* gene in groups of adolescents with different weight status.

Keywords: leptin gene, sequencing, overweight, obesity, adolescents.