

БІААРГАНІЧНАЯ ХІМІЯ
BIOORGANIC CHEMISTRY

УДК 577.218
<https://doi.org/10.29235/1561-8331-2021-57-3-300-309>

Поступила в редакцию 29.04.2021
Received 29.04.2021

**Г. В. Сергеев¹, И. В. Гайдукевич¹, А. М. Горькавая¹, М. Д. Амелиянович²,
И. Б. Моссе², С. А. Усанов¹**

¹Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь
²Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

**РАЗРАБОТКА МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
11 ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ
К РАЗВИТИЮ ОЖИРЕНИЯ**

Аннотация. С помощью метода минисеквенирования (SNaPshot анализ) разработана система для определения 11 генетических маркеров, связанных с риском развития ожирения: *rs10852521*, *rs11075990*, *rs1121980*, *rs1421085*, *rs1477196*, *rs17817449*, *rs3751812*, *rs7206790*, *rs8047395*, *rs9940128* (ген *FTO*) и *rs1137101* (ген *LEPR*). Условия проведения реакций амплификации и минисеквенирования, а также составы реакционных смесей оптимизированы так, чтобы проводить анализ по всем 11 маркерам одновременно. Полученная система апробирована и показала высокую степень воспроизводимости и чувствительности, необходимой для определения данных полиморфных вариантов.

Ключевые слова: SNP, SNaPshot, минисеквенирование, ожирение

Для цитирования. Разработка мультиплексной системы для определения 11 генетических маркеров предрасположенности к развитию ожирения / Г. В. Сергеев [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. хим. наук. – 2021. – Т. 57, № 3. – С. 300–309. <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2021-57-3-300-309>

G. V. Sergeev¹, I. V. Haidukevich¹, A. M. Gorkavaya¹, M. D. Ameliyanovich², I. B. Mosse², S. A. Usanov¹

¹Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
²Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

**DEVELOPMENT OF A MULTIPLEX SYSTEM FOR DETERMINING 11 GENETIC MARKERS
OF PREDISPOSITION TO OBESITY**

Abstract. A system has been developed to identify 11 genetic markers associated with the risk of obesity: *rs10852521*, *rs11075990*, *rs1121980*, *rs1421085*, *rs1477196*, *rs17817449*, *rs3751812*, *rs7206790*, *rs8047395*, *rs9940128* (*FTO* gene) and *rs1137101* (*LEPR* gene) by minisequencing (SNaPshot analysis). The conditions for carrying out the amplification and minisequencing reactions, as well as the compositions of the reaction mixtures, were optimized so that the analysis was carried out for all 11 markers simultaneously. The resulting system was tested and showed a high degree of reproducibility and sensitivity required for the detection of these polymorphisms.

Keywords: SNP, SNaPshot, minisequencing, obesity

For citation. Sergeev G. V., Haidukevich I. V., Gorkavaya A. M., Ameliyanovich M. D., Mosse I. B., Usanov S. A. Development of a multiplex system for determining 11 genetic markers of predisposition to obesity. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnyh navuk = Proceedings of the National Academy of Science of Belarus. Chemical series*, 2021, vol. 57, no. 3, pp. 300–309 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2021-57-3-300-309>

Введение. Избыточный вес и ожирение проявляются в аномальном и чрезмерном отложении жировой ткани в организме человека, наносящем существенный вред здоровью. По данным 2016 г. около 13 % взрослого населения планеты (11 % мужчин и 15 % женщин) страдали ожирением [1]. Кроме того, тенденция к росту количества людей с избыточным весом сохраняется. Ранее наличие большого количества пациентов с ожирением было характерно для развитых стран с высоким уровнем дохода на душу населения, однако в последнее время наблюдается значительный рост этого параметра в странах со средним и низким доходом. Так, по данным Всемирной организации здравоохранения в Африке количество детей до 5 лет с избыточным весом возросло на 24 % по сравнению с уровнем 2000 г. [2]. Избыточный вес и ожирение являются факторами

риска развития сахарного диабета 2-го типа (СД2 тип) и сердечно-сосудистых заболеваний, ожидаемая продолжительность жизни при морбидном ожирении сокращается на 9 лет у женщин и на 12 – у мужчин [3]. Развитие ожирения вызывается сочетанием чрезмерного потребления пищи, низкой физической активностью и наследственной предрасположенностью.

Проведенные исследования геномов лиц с ожирением позволили выделить ряд полиморфных вариантов генов, вносящих существенный вклад в генетическую предрасположенность к набору излишнего веса. Однако ассоциация данных полиморфных вариантов с ожирением требует уточнения для каждой конкретной популяции.

В настоящее время большое внимание уделяется профилактике ожирения, заключающейся в нормализации рациона питания, увеличения физической активности, соблюдении здорового образа жизни. Молекулярно-генетическая диагностика позволит на ранних этапах формировать группы риска среди населения и улучшить профилактические меры.

Ген *FTO* кодирует альфа-кетоглутарат зависимую диоксигеназу *FTO*, которая участвует в регуляции уровня метаболизма, энергетического баланса, термогенеза и контроле дифференцировки адипоцитов в бурые или белые жировые клетки [4].

В 2007 г. Т. М. Frayling et al. опубликовали результаты GWAS-исследования, в котором впервые была обнаружена связь гена *FTO* с риском развития диабета 2-го типа [5]. Данная связь опосредована влиянием гена *FTO* на массу тела. Так, у гомозиготных носителей аллеля *A* полиморфного варианта *rs9939609* средний вес оказался на 3 кг выше, а риск развития ожирения в 1,67 раза выше, чем у гомозигот *G/G*. Носительство данного аллеля сопряжено со сниженным липолизом, нарушением контроля аппетита, отсутствием чувства насыщения после адекватного приема пищи. Проявление неблагоприятных эффектов начинается с раннего возраста [5]. В то же время наблюдаются существенные различия в частоте минорных аллелей в зависимости от популяционной принадлежности исследуемых групп. Так, частота минорного аллеля полиморфного варианта *rs9939609* среди европейцев составляет 34–44 %, среди азиатов – 11–20, среди испанцев – 31–37 и около 17 % среди населения Южной Америки [6].

Дальнейшие исследования показали, что полиморфные варианты в гене *FTO* связаны не только с повышенным индексом массы тела (ИМТ) [7–9], но и с другими метаболическими нарушениями, такими как повышенный уровень глюкозы натощак, триглицеридов, низкий уровень холестерина в составе липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) [10]. Проведенный Sihua Peng et al. метаанализ, включающий 59 случаев-контролей исследований, подтвердил достоверную ассоциацию риска развития ожирения и пяти полиморфных вариантов гена *FTO*, находящихся в 47-килобазном блоке неравновесного сцепления, охватывающем части первых двух интронов и экзон 2: *rs9939609* (OR=1,31, 95 % CI 1,26–1,36), *rs1421085* (OR=1,43, 95 % CI 1,33–1,53), *rs8050136* (OR=1,25, 95 % CI 1,13–1,38), *rs17817449* (OR=1,54, 95 % CI 1,41–1,68) и *rs1121980* (OR=1,34, 95 % CI 1,10–1,62) [6]. К этому же блоку неравновесного сцепления относится *rs9940128*, связанный с риском раннего развития тяжелого ожирения [11]. Однако формирование блоков неравновесного сцепления, по-видимому, имеет этнические особенности, так уровень неравновесного сцепления *rs10852521* и *rs9939609* по данным *НарМар* варьирует от $D' = 0,48$ до $D' = 1,0$ в зависимости от популяции [12].

По результатам проведенных масштабных исследований, большинство изученных полиморфных вариантов гена *FTO* составляют 4–5 блоков неравновесного сцепления, в то же время *rs1477196*, приводящий к развитию ожирения при недостаточной физической активности [13], и *rs7206790*, связанный с риском увеличения веса, объема талии и ИМТ [14], наследуются независимо.

В некоторых исследованиях обнаружены не только этнические, но и половые различия в эффекте исследуемых полиморфных вариантов. К примеру, *rs11075990* и *rs3751812* показали значительную ассоциацию с ИМТ у женщин ($P=2,26 \times 10^{-6}$ и $3,04 \times 10^{-6}$ соответственно), но не у мужчин. Кроме того, для этих полиморфных вариантов наблюдаются выраженные популяционные различия: показана ассоциация с ИМТ и риском ожирения среди европейцев, в то время как среди китайцев и американцев испанского или африканского происхождения данная зависимость не наблюдалась [15].

Помимо влияния на риск ожирения достаточно хорошо изученных полиморфных вариантов гена *FTO*, имеются данные о связи некоторых из них с регуляцией гомеостаза глюкозы и эффективностью работы бета-клеток поджелудочной железы. Так, для полиморфного варианта *rs8047395* была показана ассоциация с уровнем секреции инсулина в ответ на введение глюкозы [16].

С момента открытия лептина и обнаружения его роли в регуляции аппетита, а также выявления взаимосвязи уровня сывороточного лептина с ожирением, было проведено множество исследований по поиску полиморфных вариантов как в гене, кодирующем сам гормон (*LEP*), так и в гене, кодирующем его рецептор (*LEPR*). В настоящее время известно около 10 полиморфных вариантов гена *LEP* и более 30 полиморфизмов гена *LEPR*, кроме того описаны моногенные формы ожирения, связанные с недостаточным синтезом лептина или его рецептора. Однако исследования связи полиморфных вариантов с ожирением показали значительную вариабельность результатов в зависимости от изучаемой популяции [17, 18]. Наиболее изученным полиморфным вариантом гена *LEPR* является *rs1137101*, для которого показана значимая связь с риском развития ожирения и СД 2-го типа во всех проанализированных исследованиях [19].

Для одновременного определения одиннадцати значимых маркеров предрасположенности к ожирению нами разработана мультиплексная система на основе технологии минисеквенирования с использованием генетического анализатора.

Материалы и методы. Выделение геномной ДНК из образцов слюны/крови проводили с помощью набора «Набор ДНК-ВК, ТУ ВУ 1001185129.154-2016» (ИБОХ, Республика Беларусь).

Для проведения реакции ПЦР использовали синтетические олигонуклеотиды, произведенные компаниями «Праймтех» (РБ) и «Синтол» (РФ). Амплификацию проводили в буфере, содержащем 60 мМ Tris-HCl (pH 9,0), 17 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,01 % Tween 20, 2 мМ MgCl_2 , 0,2 мМ смесь dNTP. В работе использовалась Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (NEB, 0,2 ед./25мкл ПЦР смеси).

Разделение продуктов амплификации проводили путем электрофореза в 2 %-ном агарозном геле с использованием TAE буфера и 0,5 мкг/мл бромистого этидия при условиях электрического поля 0,7 В/см². Выделение ДНК из агарозного геля проводили с использованием набора Nucleospin Gel and PCR Clean-up («Macherey-Nagel», Германия).

В ходе подготовки к реакции минисеквенирования продукты, полученные при амплификации, обрабатывали нуклеазой *EcoI* («NEB», США) и фосфатазой *rSAP* («NEB», США) (по 10 и 1 ед. соответственно на 5 мкл реакционной смеси после амплификации). Смесь инкубировали при 37 °С 1 ч с последующей инактивацией при 75 °С, 15 мин, затем охлаждали до 4 °С и развели в 10 раз деионизированной водой. Для проведения реакции минисеквенирования использовали 1,5 мкл полученной разведенной смеси, постановку реакции осуществляли с помощью набора SNaPshot Multiplex Kit («Thermo Fisher», США), затем повторяли обработку фосфатазой *rSAP* («NEB», США) (1 ед. на реакцию) при тех же условиях.

Для анализа продуктов минисеквенирования в лунку 96-луночного планшета добавляли по 9,25 мкл Hi-Di формамида («Thermo Fisher», США), 0,25 мкл размерного стандарта GeneScan 120 LIZ Size Standard («Thermo Fisher», США) и 0,5 мкл продукта SNaPshot реакции. Проводили тепловую денатурацию при 95 °С в течение 5 мин с последующим охлаждением до 10 °С.

Анализ продуктов минисеквенирования проводили на генетическом анализаторе Hitachi ABI3500 («Applied Biosystems», США) (полимер POP4 («Thermo Fisher», США), длина капилляров – 36 см) с обработкой результатов при помощи программного обеспечения GeneMapper®.

Результаты и их обсуждение. Конструирование амплификационных праймеров. Разработку праймеров осуществляли с учетом их дальнейшего мультиплексирования в одной реакции. При этом для каждого анализируемого маркера с использованием базы данных SNP NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) анализировались последовательности длиной 300 нуклеотидов, лежащие справа и слева от места мутации, на наличие часто встречающихся SNP, STR, Ins/Del. При дизайне праймеров данные области не должны были быть комплементарны первым семи нуклеотидам 3'-конца разрабатываемого праймера. Дизайн праймеров осуществляли с помощью программы Vector NTI при следующих условиях: длина ампликона – 150–300 пар нуклеотидов, длина праймера – 20–25 нуклеотидов, % GC пар 40–60, диапазон температуры плавления – 50–55 °С, отсутствие вторичных структур с энергией разрыва ниже –3,0 ккал/моль. Выбранные

праймеры для каждого маркера далее попарно сравнивались с праймерами других маркеров на вероятность образования праймер-димеров. При обнаружении праймер-димеров с энергией разрыва ниже $-3,0$ ккал/моль в праймеры вносили или точечные замены, или проводили редизайн последовательностей. Разработанные праймеры представлены в табл. 1. Попарное сравнение показало отсутствие праймер-димеров с низкой энергией разрыва, которые бы помешали одновременной работе праймеров в одной пробирке (табл. 2).

Т а б л и ц а 1. Последовательности праймеров, использованных при разработке мультиплексной системы
 Table 1. Sequences of primers used in the development of the multiplex system

Маркер	Наименование праймера	Последовательность 5'-3'	Длина ампликона, п.н.
rs10852521	Rs10852521_F	CTTACACACTTTGCTGTTGTCCCT	199
	Rs10852521_R	ACATTCTACCTTCAGAGTTGCTTG	
rs11075990	Rs11075990_F	TGGTGACAGAGCGAGACTCC	223
	Rs11075990_R	AGCCTCCTCCTGGTCTCTCTA	
rs1121980	Rs1121980_F	CCTCAGTAGATGTGTTAATGACA	206
	Rs1121980_R	AAGCCAGATAAGGAGACTACTGC	
rs9940128, rs1421085	Rs9940128_F	TCAGCTTCCCTGAACTGGAGT	288
	Rs1421085_R	GGTCTGGGAGACTACCCTACA	
rs1477196	Rs1477196_F	ATGGAGATTATAATACGCACCC	173
	Rs1477196_R	TACAACCTCACCTTGAATCAACA	
rs17817449	rs17817449_F	GCTGGTGTGAATATAGCCTAGACT	320
	rs17817449_R	GATCTATTAAGGAGCTGGACTGT	
rs3751812	Rs3751812_F	CTGTGGAACAAAAGAGATGGA	148
	Rs3751812_R	CCAAGTCCCACCCAGAGGA	
rs7206790	Rs7206790_F	TGAGTGAGTGATGTGATGTGGAT	132
	Rs7206790_R	CAAATCTGCGAAGTAAATCATCA	
rs8047395	rs8047395_F	GAGGCAAATGTGATATTGGTGT	177
	rs8047395_R	GCCCTATATTGGATCAAACATTTTC	
rs1137101	rs1137101_F	CTCAACGACACTCTCCTTATGTG	212
	rs1137101_R	TACCATCATTACAGTGTTAAGCAAAG	

С каждой разработанной парой праймеров была проведена реакция ПЦР. Для выбора оптимальной температуры отжига ПЦР реакции проводили при градиенте температуры от 60 до 70 °С. Продукты реакций разделяли электрофорезом в агарозном геле (рис. 1). Все праймеры, за исключением праймеров маркера rs11075990, с высокой специфичностью позволяют амплифицировать продукты ожидаемой длины. Увеличение температуры отжига не позволило сократить количество неспецифических продуктов для праймеров маркера rs11075990 при наличии целевого продукта на всем температурном градиенте. В дальнейших экспериментах было показано, что присутствие побочных продуктов амплификации не мешает корректно определять маркер rs11075990.

По результатам эксперимента оптимальной температурой отжига выбрана 62 °С. Несмотря на то что для всех маркеров целевые продукты амплифицировались при температуре отжига 64–66 °С, мы допускаем, что присутствие в реакционной системе ингибиторов ПЦР, ДНК низкого качества может снижать эффективность ПЦР реакции и при пограничных температурах отжига при неоптимальных условиях наработка целевых продуктов для ряда маркеров может не произойти.

Для оценки возможности совместной амплификации все праймеры были мультиплексированы в одной пробирке. Продукты амплификации разделяли методом электрофореза в агарозном геле. Область дорожки геля, содержащая фрагменты массой от 120 до 400 п.н., вырезали, фрагменты ДНК очищали от геля. Полученный пул ДНК фрагментов использовали в качестве

матрицы для постановки реакции ПЦР с каждой парой праймеров из табл. 1 отдельно. Ампликоны мультиплексной реакции не могут быть идентифицированы разделением в агарозном геле ввиду малых различий по длине, однако присутствие каждого из ожидаемых фрагментов можно подтвердить проведением последующих отдельных реакций ПЦР. Как видно на рис. 2, пул ДНК содержит все целевые фрагменты ДНК, которые послужили матрицей при постановке отдельных реакций амплификации. Разработанная система амплификации позволила мультиплексировать десять пар праймеров, с помощью которых в одной реакции происходит наработка десяти ампликонов, содержащих одиннадцать целевых маркеров. Полученные фрагменты ДНК служат матрицей для последующего SNaPshot анализа.

Таблица 2. Отрицательные значения свободной энергии Гиббса для разрыва вторичных структур при попарном сравнении разработанных праймеров для амплификации

Table 2. Negative Gibbs free energy for breaking secondary structures in pairwise comparison of the designed amplification primers

	Rs10852521_F	Rs10852521_R	Rs11075990_F	Rs11075990_R	Rs1121980_F	Rs1121980_R	Rs9940128_F	Rs1421085_R	Rs1477196_F	Rs1477196_R	rs17817449_F	rs17817449_R	Rs3751812_F	Rs3751812_R	Rs7206790_F	Rs7206790_R	rs8047395_F	rs8047395_R	rs1137101_F	rs1137101_R	
Rs10852521_F																					
Rs10852521_R																					
Rs11075990_F																					
Rs11075990_R																					
Rs1121980_F																					
Rs1121980_R																					
Rs9940128_F																					
Rs1421085_R																					
Rs1477196_F																					
Rs1477196_R																					
rs17817449_F																					
rs17817449_R																					
Rs3751812_F																					
Rs3751812_R																					
Rs7206790_F																					
Rs7206790_R																					
rs8047395_F																					
rs8047395_R																					
rs1137101_F																					
rs1137101_R																					

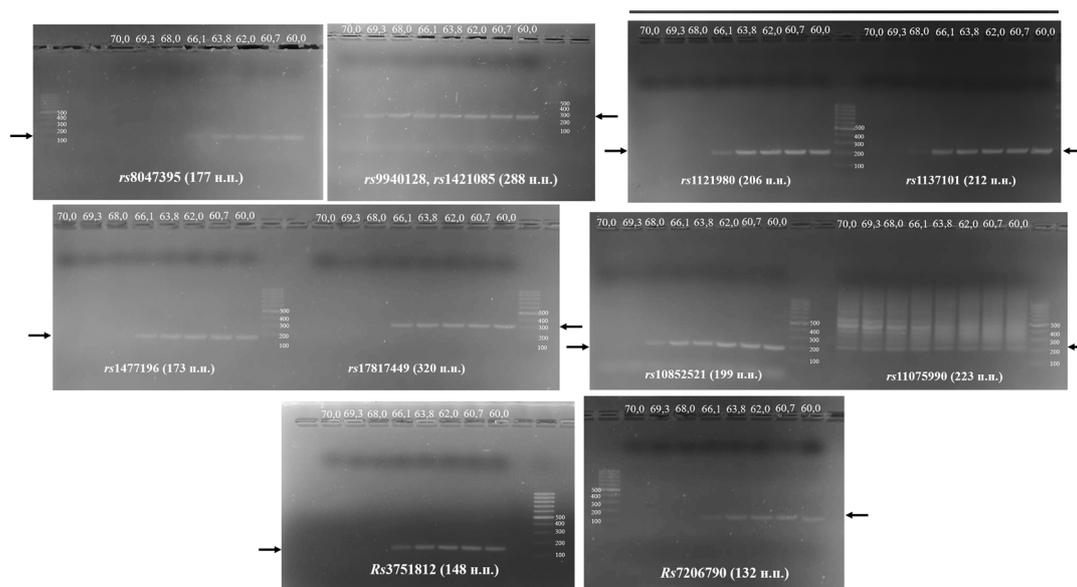


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации с использованием праймеров для амплификации при разных температурах отжига

Fig. 1. Electrophoregram of amplification products using amplification primers at different annealing temperatures

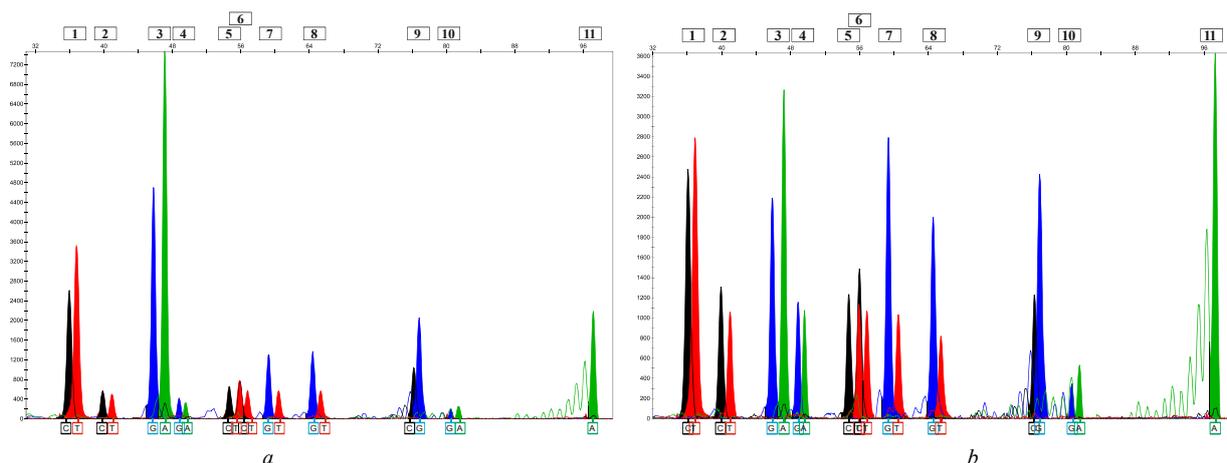


Рис. 3. Электрофореграмма продуктов минисеквенирования мультиплексной реакции до (a) и после (b) оптимизации: 1 – *rs10852521*, 2 – *rs11075990*, 3 – *rs1121980*, 4 – *rs9940128*, 5 – *rs1421085*, 6 – *rs1477196*, 7 – *rs17817449*, 8 – *rs3751812*, 9 – *rs7206790*, 10 – *rs8047395*, 11 – *rs1137101*

Fig. 3. Electropherogram of minisequencing products of multiplex reaction before (a) and after (b) optimization: 1 – *rs10852521*, 2 – *rs11075990*, 3 – *rs1121980*, 4 – *rs9940128*, 5 – *rs1421085*, 6 – *rs1477196*, 7 – *rs17817449*, 8 – *rs3751812*, 9 – *rs7206790*, 10 – *rs8047395*, 11 – *rs1137101*

SNaPshot реакции для каждого маркера отдельно позволили определить работоспособность праймеров для минисеквенирования, подвижность меченых продуктов реакции, что в свою очередь позволило создать панель «бинов» в программе GeneMapper® для всех определяемых маркеров. На следующем этапе работы праймеры для минисеквенирования были мультиплексированы с целью проверки их работоспособности в смеси. Концентрация каждого из них составила 0,2 мкМ. Как видно на рис. 3, a, постановка реакции с одиннадцатью SNaPshot праймерами позволяет идентифицировать SNP в анализируемых маркерах. Концентрации праймеров (как амплификационных, так и для минисеквенирования), использованных на предыдущих этапах работы, приводят к дисбалансам флуоресцентных сигналов у разных маркеров. В связи с этим была проведена оптимизация соотношения праймеров в мультиплексной реакции амплификации и минисеквенирования. Наибольший эффект в выравнивании сигналов на электрофореграмме оказало снижение концентрации в смесях как амплификационных, так и SNaPshot праймеров для маркера *rs1121980*, демонстрирующего наиболее интенсивный флуоресцентный сигнал. Это в свою очередь привело к увеличению сигналов для маркеров *rs11075990* (2), *rs9940128* (4) и в незначительной степени для *rs8047395* (10).

Маркеры *rs1421085* (5) и *rs1477196* (6) характеризуются одинаковым регистрируемым полиморфизмом С/Т; сигналы, получаемые от продуктов минисеквенирования, на электрофореграмме могут частично накладываться друг на друга, что может вызывать сложности в интерпретации результатов. Для решения этой задачи, с одной стороны, следует учитывать, что SNaPshot праймер, содержащий меченый ddC, обладает большей электрофоретической подвижностью, чем этот же праймер, меченый ddT. С другой стороны, при каждом эксперименте мы использовали референсный образец ДНК, обладающий максимальной гетерозиготностью по маркерам, в том числе гетерозиготностью по *rs1421085* и *rs1477196*. На основании подвижности продуктов минисеквенирования референсного стандарта, возможно скорректировать местоположения целевых продуктов исследуемых образцов при их смещении относительно «бинов» в панели программы GeneMapper®.

Заключение. Для апробации разработанной системы были проанализированы 50 образцов ДНК. Показано, что для получения достоверных результатов при реакции амплификации следует использовать 5–10 нг геномной ДНК. Проведенная работа позволила создать мультиплексную систему по определению аллельных вариантов (генотипов) одиннадцати маркеров, связанных с развитием ожирения у человека. Для интерпретации результатов создана панель, содержащая информацию о длине и флуоресцентном сигнале получаемых продуктов реакции минисеквенирования, получены референсные образцы с установленными генотипами по изучаемым маркерам.

Благодарности. Финансирование работ осуществлялось в рамках Мероприятий 6 и 9 НТП Союзного государства «ДНК- идентификация».

Acknowledgment. Funding of the work was carried out within the framework of Events 6 and 9 of the Scientific and Technical Program of the Union State “DNA identification”.

Список использованных источников

1. Информационные бюллетени: Ожирение и избыточный вес [Электронный ресурс] // Всемирная организация здравоохранения. – Режим доступа: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. – Дата доступа: 07.04.2021.
2. Boonmanunt, S. Evaluation of the effectiveness of behavioural economic incentive programmes for the promotion of a healthy diet and physical activity: a protocol for a systematic review and network meta-analysis / S. Boonmanunt [et al.] // *BMJ*. – 2020. – Vol. 10, № 12. – P. e046035. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2020-046035>
3. Проблема ожирения в Европейском регионе ВОЗ / ВОЗ; редкол.: F. Branca [и др.]. – Копенгаген: ВОЗ Европа, 2009. – 392 с.
4. Crystal structure of the FTO protein reveals basis for its substrate specificity / Z. Han [et al.] // *Nature*. – 2010. – Vol. 464, № 7292. – P. 1205–209. <https://doi.org/10.1038/nature08921>
5. A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity / T. M. Frayling [et al.] // *Science*. – 2007. – Vol. 316. – P. 889–894. <https://doi.org/10.1126/science.1141634>
6. FTO gene polymorphisms and obesity risk: a meta-analysis / S. Peng [et al.] // *BMC medicine*. – 2011. – Vol. 9, N 1. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-9-71>
7. Genome-wide association scan shows genetic variants in the FTO gene are associated with obesity-related traits / A. Scuteri [et al.] // *Plos. Genetics*. – 2007. – Vol. 3. – P. 1200–1210. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030115>
8. Replication of the association of common rs9939609 variant of FTO with increased BMI in an Australian adult twin population but no evidence for gene by environment (G × E) interaction / B. K. Cornes [et al.] // *International Journal of Obesity*. – 2009. – Vol. 33. – P. 75–79. <https://doi.org/10.1038/ijo.2008.223>
9. FTO variants are associated with obesity in the Chinese and Malay populations in Singapore / J. T. Tan [et al.] // *Diabetes*. – 2008. – Vol. 57. – P. 2851–2857. <https://doi.org/10.2337/db08-0214>
10. Freathy, R. M. Common variation in the FTO gene alters diabetes-related metabolic traits to the extent expected given its effect on BMI / R. M. Freathy // *Diabetes*. – 2008. – Vol. 57. – P. 1419–1426. <https://doi.org/10.2337/db07-1466>
11. Variations in the FTO gene are associated with severe obesity in the Japanese / K. Hotta [et al.] // *J. Hum. Genet.* – 2008. – Vol. 53, № 6. – P. 546–553. <https://doi.org/10.1007/s10038-008-0283-1>
12. Genetic association of SNPs in the FTO gene and predisposition to obesity in Malaysian Malays / Y.D. Apalasyam [et al.] // *Braz. J. Med. Biol. Res.* – 2012. – Vol. 45, № 12. – P. 1119–1126. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2012007500134>
13. Physical Activity and the Association of Common FTO Gene Variants With Body Mass Index and Obesity / E. Rampersaud [et al.] // *Arch. Intern. Med.* – 2008. – Vol. 168, № 16. – P. 1791–1797. <https://doi.org/10.1001/archinte.168.16.1791>
14. Rs7206790 and rs11644943 in FTO gene are associated with risk of obesity in Chinese school-age population / Y. Xu [et al.] // *PLoS One*. – 2014. – Vol. 9, № 9. – P. e108050. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108050>
15. Replication of 6 obesity genes in a meta-analysis of genome-wide association studies from diverse ancestries / L. J. Tan [et al.] // *PLoS One*. – 2014. – Vol. 9, № 5. – P. e96149. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096149>
16. Analysis of FTO gene variants with obesity and glucose homeostasis measures in the multiethnic Insulin Resistance Atherosclerosis Study cohort / M. R. Wing [et al.] // *Int. J. Obes (Lond)*. – 2011. – Vol. 35, № 9. – P. 1173–1182. <https://doi.org/10.1038/ijo.2010.244>
17. Leptin G-2548A and leptin receptor Q223R gene polymorphisms are not associated with obesity in Romanian subjects / A. Constantin [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2010. – Vol. 391. – P. 282–286. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.11.050>
18. Effect of genetic variation in the leptin gene promoter and the leptin receptor gene on obesity risk in a population-based case-control study in Spain / O. Portoles [et al.] // *Eur. J. Epidemiol.* – 2006. – Vol. 21. – P. 605–612. <https://doi.org/10.1007/s10654-006-9045-6>
19. Variations in the obesity gene “LEPR” contribute to risk of type 2 diabetes mellitus: evidence from a meta-analysis / M. M. Yang [et al.] // *Journal of diabetes research*. – 2016. – Article ID 5412084. – P. 1–12. <https://doi.org/10.1155/2016/5412084>

References

1. *Fact sheets: Obesity and overweight. World Health Organization.* Available at: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> (accessed 7 April 2021) (in Russian).
2. Boonmanunt S., Pattanapratchep O., Ongphiphadhanakul B., McKay G., Attia J., Thakkinian A. Evaluation of the effectiveness of behavioural economic incentive programmes for the promotion of a healthy diet and physical activity: a protocol for a systematic review and network meta-analysis. *BMJ Open*, 2020, vol. 10, no. 12, pp. e046035. <http://doi.org/10.1136/bmjopen-2020-046035>
3. Branca F. (ed.) [et al.]. *Obesity in the WHO European Region.* Copenhagen, WHO Regional Office for Europe, 2009. 392 p. (in Russian).

4. Han Z., Niu T., Chang J., Lei X., Zhao M., Wang Q., Cheng W., Wang J., Feng Y., Chai J. Crystal structure of the FTO protein reveals basis for its substrate specificity. *Nature*, 2010, vol. 464, no. 7292, pp. 1205–1209. <http://doi.org/10.1038/nature08921>
5. Frayling T. M., Timpson N. J., Weedon M. N., Zeggini E., Freathy R. M., Lindgren C. M., Perry J. R., Elliott K. S., Lango H. A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science*, 2007, vol. 316, no. 5826, pp. 889–894. <http://doi.org/10.1126/science.1141634>
6. Peng S., Zhu Y., Xu F., Ren X., Li X., Lai M. FTO gene polymorphisms and obesity risk: a meta-analysis. *BMC Medicine*, 2011, vol. 9, no. 71. <http://doi.org/10.1186/1741-7015-9-71>
7. Scuteri A., Sanna S., Chen W. M., Uda M., Albai G., Strait J., Najjar S., Nagaraja R., Orru M., Usala G., Dei M., Lai S., Maschio A. Genome-wide association scan shows genetic variants in the FTO gene are associated with obesity-related traits. *PLoS Genetics*, 2007, vol. 3, no. 7, pp. e115. <http://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030115>
8. Cornes B. K., Lind P. A., Medland S. E., Montgomery G. W., Nyholt D. R., Martin N. G. Replication of the association of common rs9939609 variant of FTO with increased BMI in an Australian adult twin population but no evidence for gene by environment (G x E) interaction. *International Journal of Obesity*, 2009, vol. 33, no. 1, pp. 75–79. <http://doi.org/10.1038/ijo.2008.223>
9. Tan J. T., Dorajoo R., Seielstad M., Sim X. L., Ong R. T., Chia K. S., Wong T. Y., Saw S. M., Chew S. K., Aung T., Tai E. S. FTO variants are associated with obesity in the Chinese and Malay populations in Singapore. *Diabetes*, 2008, vol. 57, no. 10, pp. 2851–2857. <http://doi.org/10.2337/db08-0214>
10. Freathy R. M., Timpson N. J., Lawlor D. A., Pouta A., Ben-Shlomo Y., Ruokonen A., Ebrahim S., Shields B., Zeggini E., Weedon M. N., Lindgren C. M. Common variation in the FTO gene alters diabetes-related metabolic traits to the extent expected given its effect on BMI. *Diabetes*, 2008, vol. 57, no. 5, pp. 1419–1426. <http://doi.org/10.2337/db07-1466>
11. Hotta K., Nakata Y., Matsuo T., Kamohara S., Kotani K., Komatsu R., Itoh N., Mineo I., Wada J., Masuzaki H., Yoneda M., Nakajima A., Miyazaki S. Variations in the FTO gene are associated with severe obesity in the Japanese. *Journal of Human Genetics*, 2008, vol. 53, no. 6, pp. 546–553. <http://doi.org/10.1007/s10038-008-0283-1>
12. Apal Sammy Y. D., Ming M. F., Rampal S., Bulgiba A., Mohamed Z. Genetic association of SNPs in the FTO gene and predisposition to obesity in Malaysian Malays. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2012, vol. 45, no. 12, pp. 1119–1126. <http://doi.org/10.1590/s0100-879x2012007500134>
13. Rampersaud E., Mitchell B. D., Pollin T. I., Fu M., Shen H., O'Connell J. R., Ducharme J. L., Hines S., Sack P., Naglieri R., Shuldiner A. R., Snitker S. Physical activity and the association of common FTO gene variants with body mass index and obesity. *Archives of Internal Medicine*, 2008, vol. 168, no. 16, pp. 1791–1797. <http://doi.org/10.1001/archinte.168.16.1791>
14. Xu Y., Ling J., Yang M., Wang H., Zhang S., Zhang X., Zhu Y. Rs7206790 and rs11644943 in FTO gene are associated with risk of obesity in Chinese school-age population. *PLoS One*, 2014, vol. 9, no. 9, pp. e108050. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0108050>
15. Tan L. J., Zhu H., He H., Wu K. H., Li J., Chen X. D., Zhang J. G., Shen H., Tian Q., Krousel-Wood M., Papasian C. J., Bouchard C., Perusse L., Deng H. W. Replication of 6 obesity genes in a meta-analysis of genome-wide association studies from diverse ancestries. *PLoS One*, 2014, vol. 9, no. 5, pp. e96149. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0096149>
16. Wing M. R., Ziegler J. M., Langefeld C. D., Roh B. H., Palmer N. D., Mayer-Davis E. J., Rewers M. J., Haffner S. M., Wagenknecht L. E., Bowden D. W. Analysis of FTO gene variants with obesity and glucose homeostasis measures in the multiethnic Insulin Resistance Atherosclerosis Study cohort. *International Journal of Obesity*, 2011, vol. 35, no. 9, pp. 1173–1182. <http://doi.org/10.1038/ijo.2010.244>
17. Constantin A., Costache G., Sima A. V., Glavce C. S., Vladica M., Popov D. L. Leptin G-2548A and leptin receptor Q223R gene polymorphisms are not associated with obesity in Romanian subjects. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2010, vol. 391, no. 1, pp. 282–286. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.11.050>
18. Portoles O., Sorli J. V., Frances F., Coltell O., Gonzalez J. I., Saiz C., Corella D. Effect of genetic variation in the leptin gene promoter and the leptin receptor gene on obesity risk in a population-based case-control study in Spain. *European Journal of Epidemiology*, 2006, vol. 21, no. 8, pp. 605–612. <http://doi.org/10.1007/s10654-006-9045-6>
19. Yang M. M., Wang J., Fan J. J., Ng T. K., Sun D. J., Guo X., Teng Y., Li Y. B. Variations in the Obesity Gene “LEPR” Contribute to Risk of Type 2 Diabetes Mellitus: Evidence from a Meta-Analysis. *Journal of Diabetes Research*, 2016, vol. 2016, pp. 1–12. <http://doi.org/10.1155/2016/5412084>

Информация об авторах

Геннадий Валерьевич Сергеев – канд. хим. наук, зав. лаб. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Акад. В. Ф. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: gvserg@iboch.by

Ирина Витальевна Гайдукевич – канд. хим. наук, ст. науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Акад. В. Ф. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: ribano4ka@gmail.com

Анна Михайловна Горькавая – науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Акад.

Information about the authors

Gennady V. Sergeev – Ph. D. (Chemistry), Head of the Laboratory. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Acad. Kuprevich Str., Minsk, Republic of Belarus). E-mail: gvserg@iboch.by

Irina V. Haidukevich – Ph. D. (Chemistry), Senior Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Acad. Kuprevich Str., Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ribano4ka@gmail.com

Anna M. Gorkavaya – Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences

В. Ф. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: annagorkavaya@gmail.com

Максим Дмитриевич Амелянович – науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: M.Ameliyanovich@igc.by

Ирма Борисовна Моссе – д-р биол. наук, профессор, гл. науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: I.Mosse@igc.by

Сергей Александрович Усанов – член-корреспондент, д-р хим. наук, профессор, гл. науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Акад. В. Ф. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: usanov@iboch.by

of Belarus (5/2, Acad. Kuprevich Str., Minsk, Republic of Belarus). E-mail: annagorkavaya@gmail.com

Maxim D. Ameliyanovich – Researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya str., Minsk, Republic of Belarus). E-mail: M.Ameliyanovich@igc.by

Irma B. Mosse – D. S. (Biology), Professor, Principal Researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya str., Minsk, Republic of Belarus). E-mail: I.Mosse@igc.by

Sergei A. Usanov – Corresponding Member of the National Academy of Sciences of Belarus, D. S. (Chemistry), Professor, Principal Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Acad. Kuprevich Str., Minsk, Republic of Belarus). E-mail: usanov@iboch.by