

ГЕНЕТИКА, ПРОТЕОМИКА И МЕТАБОЛОМИКА GENETICS, PROTEOMICS AND METABOLOMICS

СЕКВЕНИРОВАНИЕ ФРАГМЕНТА ГЕНА ЛЕПТИНА У ПОДРОСТКОВ С РАЗНЫМ СТАТУСОМ ВЕСА

Баирова Т.А.,
Ершова О.А.,
Самбялова А.Ю.,
Беляева Е.В.,
Синьков В.В.,
Рычкова Л.В.

ФГБНУ «Научный центр проблем
здоровья семьи и репродукции
человека» (664003, г. Иркутск,
ул. Тимирязева, 16, Россия)

Автор, ответственный за переписку:
Ершова Оксана Александровна,
e-mail: oksana111088@mail.ru

РЕЗЮМЕ

Ожирение – значимая социальная проблема среди населения всего мира. В настоящее время ген лептина (LEP) рассматривается как потенциальный ген-кандидат, влияющий на метаболические нарушения, ассоциированные с предрасположенностью к избыточной массе тела и ожирению. Лептин играет важную роль в гомеостазе массы тела, влияя на потребление пищи и расход энергии и поддерживая постоянные запасы энергии. Дефект гена лептина может быть одной из причин ожирения и, как следствие, различных патологий, связанных с ожирением.

Цель исследования. Поиск однонуклеотидных полиморфизмов (SNP, single-nucleotide polymorphism) гена лептина у подростков с разным статусом веса.

Методы. В исследовании приняли участие 20 подростков 11–17 лет с нормальной массой тела и избыточной массой тела/ожирением. Методы исследования: оценка клинического статуса с антропометрией; секвенирование по методу Сенгера фрагмента гена лептина, локализованного в интроне данного гена – (5'-AGCCTTGTTTCATCATCTGGA, 3'-TGGGAGGAATCGCTCTCAGA). Также проведена биоинформационная обработка результатов секвенирования.

Результаты. В результате исследования проведён подбор оптимальных условий амплификации участка гена лептина размером 891 п. н. для вышеуказанной пары праймеров гена LEP (s16_L891, s16_R891). По результатам секвенирования идентифицировано 45 однонуклеотидных замен гена LEP, в том числе 23 однонуклеотидные замены ранее не зарегистрированные в GenBank. В группе подростков с избыточной массой тела и ожирением идентифицировано 14 незарегистрированных однонуклеотидных замен гена LEP и 13 зарегистрированных SNP в базе данных GenBank. В группе подростков с нормальной массой тела данные SNP не обнаружены.

Ключевые слова: ген лептина, секвенирование, избыточная масса тела, ожирение, лептин

Статья поступила: 17.07.2023
Статья принята: 15.08.2023
Статья опубликована: 28.09.2023

Для цитирования: Баирова Т.А., Ершова О.А., Самбялова А.Ю., Беляева Е.В., Синьков В.В., Рычкова Л.В. Секвенирование фрагмента гена лептина у подростков с разным статусом веса. *Acta biomedica scientifica*. 2023; 8(4): 92-100. doi: 10.29413/ABS.2023-8.4.10

SEQUENCING OF A FRAGMENT OF THE LEPTIN GENE IN ADOLESCENTS WITH DIFFERENT WEIGHT STATUS

Bairova T.A.,
Ershova O.A.,
Sambyalova A.Yu.,
Belyaeva E.V.,
Sinkov V.V.,
Rychkova L.V.

Scientific Centre for Family Health
and Human Reproduction Problems
(Timiryazeva str. 16, Irkutsk 664003,
Russian Federation)

Corresponding author:
Oksana A. Ershova,
e-mail: oksana111088@mail.ru

ABSTRACT

Background. Obesity is a significant social problem among the population of the world. The leptin gene (*LEP*) is currently considered as a potential candidate gene influencing metabolic disorders associated with predisposition to overweight and obesity. Leptin plays an important role in body weight homeostasis by influencing food intake and energy expenditure and maintaining constant energy stores. A defect in the leptin gene may be one of the causes of obesity and, as a result, of various obesity-associated pathologies.

The aim of the study. To search for single-nucleotide polymorphisms (SNP) of the leptin gene in adolescents with different weight status.

Methods. The study involved 20 adolescents aged 11–17 years with normal body weight and overweight/obesity. Research methods: assessment of clinical status with anthropometry; Sanger sequencing of the leptin gene fragment localized in the intron of this gene – (5'-AGCCTTGTTTCATCATCTGGA, 3'-TGGGAG-GAATCGCTCTCAGA). We also carried out bioinformatic processing of sequencing results.

Results. As a result of the study, the optimal conditions for amplification of the 891 bps leptin gene region were selected for the above mentioned primer pair of the *LEP* gene (*s16_L891*, *s16_R891*). Based on the results of sequencing, 45 single nucleotide substitutions of the *LEP* gene were identified, including 23 single nucleotide substitutions which were not previously registered in GenBank. In the group of adolescents with overweight and obesity, 14 unregistered single nucleotide substitutions of the *LEP* gene and 13 registered SNPs were identified in the GenBank database. In the group of adolescents with normal body weight, these SNPs were not found.

Key words: leptin gene, sequencing, overweight, obesity, leptin

Received: 17.07.2023
Accepted: 15.08.2023
Published: 28.09.2023

For citation: Bairova T.A., Ershova O.A., Sambyalova A.Yu., Belyaeva E.V., Sinkov V.V., Rychkova L.V. Sequencing of a fragment of the leptin gene in adolescents with different weight status. *Acta biomedica scientifica*. 2023; 8(4): 92-100. doi: 10.29413/ABS.2023-8.4.10

ВВЕДЕНИЕ

Детское ожирение – одна из серьёзных проблем здравоохранения. В настоящее время наблюдается значительный рост количества детей и подростков с избыточной массой тела и ожирением, при этом большинство из них страдают ожирением и в зрелом возрасте [1]. Риск ожирения и его последствия во взрослом возрасте выше, если проблема начинается в детстве. Ожирение является причиной развития сахарного диабета 2-го типа, неалкогольной жировой болезни печени, сердечно-сосудистых и других заболеваний [2–9].

Регуляция массы тела – комплексный процесс нейрорегуляторной регуляции с вовлечением различных нейротрансмиттеров, в том числе лептина. Лептин – полипептидный гормон, секретируемый жировой тканью и обеспечивающий регуляцию энергетических, нейроэндокринных и метаболических процессов в организме. Лептин оказывает своё влияние на процессы потребления и расхода энергии, метаболизм жиров и углеводов, выработку гормонов гипоталамуса и гипофиза [10].

Ген лептина (*LEP*) расположен на 7-й хромосоме и состоит из трёх экзонов, разделённых двумя интронами [11, 12]. По данным Национального центра биоинформационных технологий (NCBI, National Center for Biotechnology Information), для этого гена описано 4239 однонуклеотидных замен [13]. Сегодня наибольший интерес вызывают 2 полиморфизма (*rs2167270*, *rs7799039*), вклад которых в формирование метаболических нарушений у пациентов с ожирением доказан [14].

Поиск иных, в том числе новых, полиморфизмов гена лептина, их вклад в формирование нарушений метаболизма у пациентов разных рас, популяций и разных возрастных групп актуален до настоящего времени.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Поиск однонуклеотидных полиморфизмов (SNP, single-nucleotide polymorphisms) гена лептина у подростков с разным статусом веса.

МЕТОДЫ

В исследование включено 20 подростков в возрасте от 11 до 17 лет ($14,8 \pm 0,45$ года), в том числе 14 девочек и 6 мальчиков, с разным статусом веса: 12 подростков с избыточной массой тела и ожирением (SDS индекса массы тела (ИМТ) > 1), 8 подростков с нормальной массой тела (SDS ИМТ < 1). Все подростки – европеоиды (на примере русских). Характеристика групп представлена в таблице 1.

Таким образом, группы сопоставимы по полу и возрасту. Средние значения антропометрических показателей статистически значимо отличаются между группами с разным статусом веса – с нормальной и избыточной массой тела.

В работе с подростками соблюдали этические принципы, предъявляемые Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации (World Medical Association Declaration of Helsinki, 1964 г. в редакции 2013 г.; изменения внесены на 64-й Генеральной Ассамблее ВМАЮ, Бразилия) и п. 5 ст. 24 «Права несовершеннолетних» Основ законодательства Российской Федерации об охране здоровья граждан от 22.07.1993 № 5487-1 (с изменениями от 20.12.1999). Все участники имеют информированное согласие родителей (в случае если возраст обследуемого меньше 14 лет) или информированное согласие обследуемого (в случае если возраст обследуемого 14 лет и старше).

При включении в исследование подросткам измеряли линейный рост и массу тела (МТ), затем рассчитывали индекс массы тела (ИМТ; $\text{кг}/\text{м}^2$). Субъектов взвешивали с точностью до 0,1 кг в стандартной лёгкой одежде и без обуви на платформенных ручных весах. Рост измеряли стационарным ростомером с точностью до 0,1 см. ИМТ рассчитывали как вес человека в кг, делённый на его рост в м^2 . Оценку росто-весовых параметров подростков проводили с использованием референтных значений ВОЗ при помощи калькулятора AnthroPlus [15]. Для ИМТ определены значения стандартного отклонения от средних популяционных значений – коэффициент стандартного отклонения (SDS,

ТАБЛИЦА 1
ХАРАКТЕРИСТИКА ИССЛЕДУЕМЫХ ГРУПП ПОДРОСТКОВ

Показатели	Контрольная группа ($n = 8$), Me [Q_1 ; Q_3]	Группа с избыточным весом и ожирением ($n = 12$), Me [Q_1 ; Q_3]	p
Возраст (лет)	16,5 [14,75; 17]	14,5 [13,5; 16]	0,97
Рост (см)	167,2 [161,825; 183,1]	158,5 [155,25; 163,125]	0,031*
Вес (кг)	63 [57,95; 66,25]	74,8 [72; 82,975]	0,001*
ИМТ ($\text{кг}/\text{м}^2$)	20,4 [19,625; 21,575]	30,05 [27,80; 33,15]	0,000016*
SDS ИМТ	0,04 [-0,49; 0,9225]	2,845 [2,335; 3,065]	0,000016*

Примечание. * – отмеченные критерии статистически значимы на уровне $p < 0,05$, при сравнении использован тест Манна – Уитни.

TABLE 1
CHARACTERISTICS OF STUDIED GROUPS
OF ADOLESCENTS

Standard Deviation Score) рассчитывался в компьютерном приложении Auxology 1.0 b17 (Pfizer, США). Избыточной считали ИМТ при ИМТ в пределах 25,0–29,9 кг/м², ожирение – при ИМТ = 30 кг/м² [16].

Для анализа ДНК образцы крови собирали в вакуумные пробирки объемом 5 мл, содержащие K₃-этилендиаминтетрауксусную кислоту (K₃ЭДТА). Выделение ДНК проводили сорбентным методом с использованием набора «ДНК сорб-В» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора).

Подбор праймеров осуществлён с использованием программы «Primer-BLAST» [17] (рис. 1). Олигонуклеотиды синтезированы в ЗАО «Евроген».

Одна из пар праймеров подобрана к фрагменту гена лептина размером 891 п. н., локализованному в интронной части данного гена:

1) s16_L891 – 5'-AGCCTGTTTTCATCATCTGGA (абсолютное количество нуклеотидов – 22, молекулярный вес 6670 (Mw)г/моль);

2) s16_R891 – 3'-TGGGAGGAATCGCTCTCAGA 9 (абсолютное количество нуклеотидов – 20, молекулярный вес 6163 (Mw)г/моль).

Для данной пары проведён подбор оптимальных условий амплификации.

Из лиофилизированных образцов олигонуклеотидов путём разведения деионизованной водой подготовлены стоковые растворы с концентрацией 100 мкмоль/мл, которые в дальнейшем разбавлены до конечной концентрации 20 мкмоль/мл.

Для подбора температуры отжига праймеров использовали два подхода. Первый – с помощью расчёта по формуле: $T = 2(AT) + 4(GC)$ (инструкция к реагенту «ScreenMix»), где T – температура отжига праймеров; AT – кол-во нуклеотидов аденин и тимин; GC – кол-во нуклеотидов гуанин и цитозин, входящих в праймер. Второй – с применением онлайн-калькулятора «Thermo Fisher» (Thermo Fisher Scientific, США) [19].

Экспериментальные постановки полимеразной цепной реакции (ПЦР) проводили в объёме 10 мкл реакционной смеси. Компоненты ПЦР смешивали в последовательности и объёмах, приведённых в таблице 2, по протоколу к реагенту «ScreenMix» (5X ScreenMix, ЗАО «Евроген», Россия).

тельности и объёмах, приведённых в таблице 2, по протоколу к реагенту «ScreenMix» (5X ScreenMix, ЗАО «Евроген», Россия).

ТАБЛИЦА 2
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ВНЕСЕНИЯ И ОБЪЁМЫ КОМПОНЕНТОВ ПЦР-СМЕСИ ДЛЯ 1 ОБРАЗЦА ДНК И ОБЩЕГО ОБЪЁМА ПЦР-СМЕСИ 10 МКЛ

TABLE 2
THE SEQUENCE OF APPLICATION AND THE COMPONENT VOLUMES OF THE PCR MIXTURE FOR 1 DNA SAMPLE AND THE TOTAL VOLUME OF THE 10 ML PCR MIXTURE

Компоненты	Количество (мкл)
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 объём ПЦР-смеси	10,0

ПЦР проводили в амплификаторе «ДТ прайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) по программе производителя «ScreenMix», представленной в таблице 3.

Размеры фрагментов ампликонов для каждого образца оценивали с помощью электрофореза в 1,5%-м агарозном геле в 1xTAE буфере с добавлением этидиум бромида, при электрическом напряжении U = 146 В, в течение 2 часов.

Для секвенирования использовали наборы реагентов «BigDye™ Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit» (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с инструкцией производителя. Продукты реакции очищали преципитацией 75%-м изопропиловым спиртом. Последовательности нуклеотидов определяли на автомати-

Homo sapiens leptin (LEP), RefSeqGene on chromosome 7

NCBI Reference Sequence: NG_007450.1
GenBank FASTA

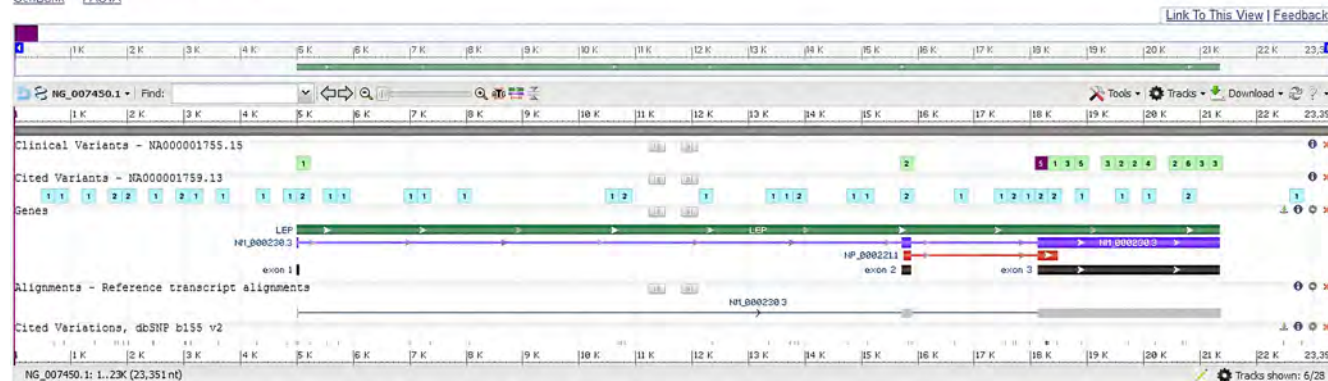


РИС. 1.
Скриншот Reference Sequence LEP [18]

FIG. 1.
Reference Sequence LEP screenshot

**ТАБЛИЦА 3
ПРОГРАММА АМПЛИФИКАЦИИ**

Стадия	Температура, °C	Время инкубации	Кол-во циклов
1 Предварительная денатурация:	95°	5 мин	1
Денатурация	95°	30 с	
2 Отжиг праймеров	52–70°	30 с	40
Элонгация	72°	30 с	
3 Хранение	4°	–	–

**TABLE 3
AMPLIFICATION PROGRAM**

ческом секвенаторе «НАНОФОР 05» (ООО «Синтол», Россия). Данная работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Центр разработки прогрессивных персонализированных технологий здоровья» ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ (Иркутск).

Результаты секвенирования прошли биоинформационную обработку. Оценка качества хроматограмм проведена в программе UGENE (Unipro, Россия). Хроматограммы обработаны с помощью программы R v. 4.2.3. Полученные нуклеотидные последовательности выравнивали на референсную последовательность гена *LEP* – NG_007450.1 RefSeqGene – и сравнивали между собой в программе «MEGA 11» (Pennsylvania State University, США).

Этическая экспертиза

Проведение данного исследования одобрено этическим комитетом ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» (протокол № 9 от 08.10.2014).

РЕЗУЛЬТАТЫ

На первом этапе проведён подбор температурных условий ПЦР для анализируемой пары праймеров (олигонуклеотиды *s16_L891*, *s16_R891*). Согласно представленной выше формуле подбора температуры отжига праймеров, температура как для левого (*s16_L891*), так и для правого (*s16_R891*) праймера составила 62°C. Аналогичный расчёт с помощью онлайн-калькулятора Thermo Fisher Scientific (США) показал температуру отжига 63,2 °C. Известно, что градиент температуры отжига должен начинаться с температуры на 6–10 °C ниже калькулируемой температуры отжига, в связи с чем на первом этапе эксперимента нами определены три варианта температуры отжига праймеров – 56 °C, 58 °C и 60 °C.

Постановку ПЦР проводили с 5 образцами ДНК. Реагенты вносили в последовательности и объёмах, представленных в таблице 2. Для проведения ПЦР использовали программу, приведённую в таблице 3. Электрофореграмма с результатами эксперимента представлена на рисунке 2.

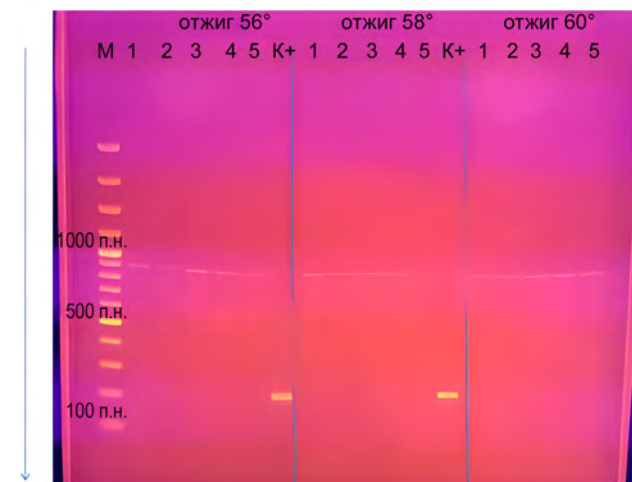


РИС. 2.
Электрофореграмма: пара праймеров гена *LEP* – *s16_L891*, *s16_R891*; три варианта температурной полки для этапа отжига – 56 °C, 58 °C и 60 °C

FIG. 2.
Electrophogram: the *LEP* gene primers – *s16_L891*, *s16_R891*; three variants of the temperature shelf for the annealing stage – 56 °C, 58 °C and 60 °C

По результатам всех трёх экспериментальных ПЦР-постановок амплификация прошла удовлетворительно. В геле наблюдаются ПЦР-продукты размером 891 п. н. в дорожках с ампликонами ДНК. Отжиг праймеров при температуре 60 °C явился наиболее оптимальным, т. к. при этом режиме амплификации в геле наблюдается наименьшее количество продуктов неспецифичной амплификации.

В связи с этим следующим шагом по подбору условий амплификации для исследуемой пары праймеров был эксперимент, в котором количество праймеров снижено на 10 % от указанного в таблице 2, температура отжига праймеров градиентно повышена на 2 °C (отжиг 62 °C) и 4 °C (отжиг 64 °C) (рис. 3).

Анализ разделения ПЦР-продуктов, представленных на рисунке 3, показал, что снижение количества праймеров на 10 % от отжигом праймеров при всех температурных режимах привело к ожидаемому результату – в геле присутствуют специфичные ПЦР-продукты размером 891 п. н. в дорожках с ампликонами ДНК и отсутствуют продукты неспецифичной амплификации.

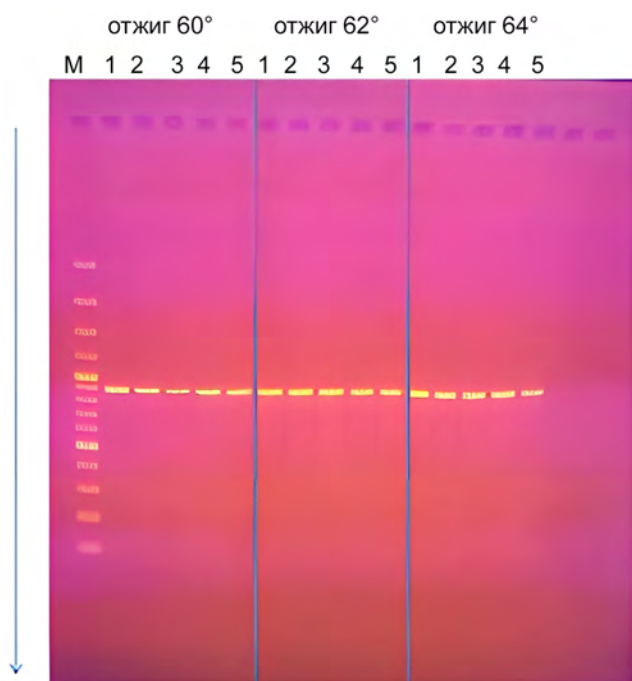


РИС. 3.
 Электрофорограмма: пара праймеров гена *LEP* – *s16_L891*, *s16_R891*; количество праймеров снижено на 10 %; три варианта температурной полки для этапа отжига – 60 °С, 62 °С и 64 °С

FIG. 3.
 Electrophogram: *LEP* gene primers – *s16_L891*, *s16_R891*; the number of primers reduced by 10 %; three variants of the temperature shelf for the annealing stage – 60 °С, 62 °С и 64 °С

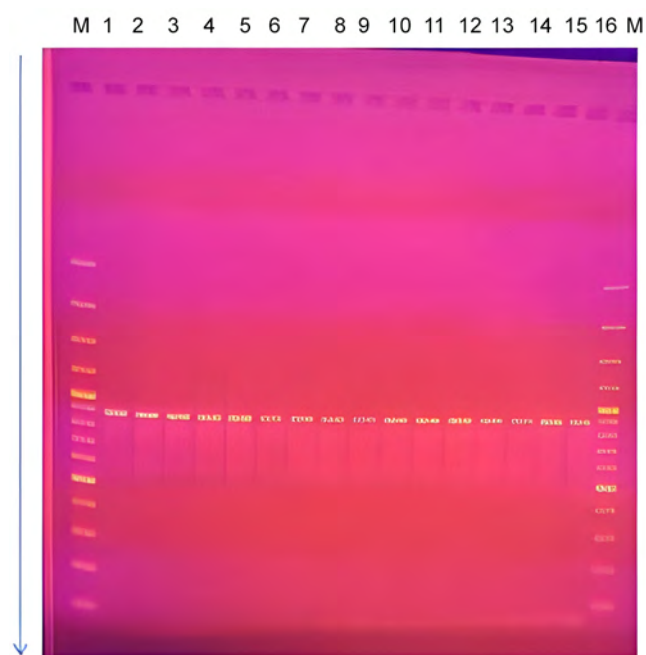


РИС. 4.
 Фото фрагмента электрофорограммы: пара праймеров гена *LEP* – *s16_L891*, *s16_R891*; количество праймеров снижено на 10 %; отжиг праймеров – 60 °С; образцы ДНК с 1 по 16

FIG. 4.
 Fragment of the electrophogram: *LEP* gene primers – *s16_L891*, *s16_R891*; number of primers reduced by 10 %; primer annealing at 60 °С; DNA samples from 1 to 16

Таким образом, для анализируемого фрагмента гена лептина подобраны оптимальные условия для проведения ПЦР.

Следующий этап работы с анализируемой парой праймеров – амплификация 20 образцов ДНК с использованием подобранных условий в объёме реакционной смеси 50 мкл. Реагенты для ПЦР смеси вносили в последовательности и объёмах, согласно таблице 4. Образцы ДНК вносили по 10 мкл. Результат постановки ПЦР представлен на рисунке 4.

ТАБЛИЦА 4
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ВНЕСЕНИЯ И ОБЪЁМЫ КОМПОНЕНТОВ ПЦР-СМЕСИ ДЛЯ 20 ОБРАЗЦОВ ДНК И ОБЩЕГО ОБЪЁМА ПЦР-СМЕСИ 50 МКЛ
TABLE 4

THE SEQUENCE OF APPLICATION AND COMPONENT VOLUMES OF THE PCR MIXTURE FOR 20 DNA SAMPLES AND THE TOTAL VOLUME OF THE 50 ML PCR MIXTURE

Компонент	Количество (мкл)
Стерильная вода	528
Screen Mix	200
ПЦР-праймер 1 (L – левый)	36
ПЦР-праймер 2 (R – правый)	36

Полученные ампликоны использованы для секвенирования гена *LEP* по методу Сэнгера, согласно протоколу производителя набора реагентов.

На следующем этапе работы проведён анализ хроматограмм с поиском SNP гена лептина *LEP* у подростков-европеоидов с разным статусом веса.

По результатам выравнивания полученных данных на референсную последовательность гена лептина из базы данных NCBI (NG_007450.1) нами идентифицировано 45 SNP, в том числе 22 SNP, ранее зарегистрированных, и 23 SNP, ранее не зарегистрированных в GenBank (01.02.2022) (табл. 5).

Таким образом, в группе подростков с избыточной массой тела и ожирением обнаружено 14 SNP гена лептина, не зарегистрированных в базе данных GenBank.

Более того, по результатам секвенирования праймеров *s16_L891* и *s16_R891* гена *LEP* в 22 ранее зарегистрированных SNP нами идентифицированы 12 новых нуклеотидных замен (табл. 6).

Подана заявка на регистрацию в GenBank 23 выявленных впервые в мире полиморфизмов гена лептина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам секвенирования фрагмента гена *LEP* для пары праймеров (*s16_L891*, *s16_R891*), выявлен-

ТАБЛИЦА 5
ПЕРЕЧЕНЬ ВПЕРВЫЕ ВЫЯВЛЕННЫХ
(НЕ ЗАРЕГИСТРИРОВАННЫЕ В GENBANK) SNP ГЕНА
ЛЕПТИНА У ПОДРОСТКОВ С РАЗНЫМ СТАТУСОМ ВЕСА

TABLE 5
LIST OF NEWLY IDENTIFIED (NOT REGISTERED
IN GENBANK) SNPS OF THE LEPTIN GENE IN ADOLESCENTS
WITH DIFFERENT WEIGHT STATUS

№ п/п	Позиция в гене	Выявленная нуклеотидная замена	Количество подростков с SDS ИМТ < 1 (абс.)	Количество подростков с SDS ИМТ > 1 (абс.)
1	Ch 7:128254003	G>C,T	2	1
2	Ch 7:128254031	G>T	3	0
3	Ch 7:128254086	A>T,G	3	0
4	Ch 7:128254131	A>T	0	3
5	Ch 7:128254135	G>T	1	3
6	Ch 7:128254139	C>T	0	3
7	Ch 7:128254145	A>T	0	2
8	Ch 7:128254146	G>T,C	2	2
9	Ch 7:128253548	C>T	0	1
10	Ch 7:128253560	A>T	0	1
11	Ch 7:128253561	A>T	0	1
12	Ch 7:128253565	T>C	0	1
13	Ch 7:128253877	G>A	0	1
14	Ch 7:128254051	G>A	1	0
15	Ch 7:128254064	G>C	1	0
16	Ch 7:128254070	C>T	0	1
17	Ch 7:128254083	G>C	1	0
18	Ch 7:128254084	G>A	0	1
19	Ch 7:128254089	G>T	0	1
20	Ch 7:128254094	C>G	1	0
21	Ch 7:128254121	C>T	0	1
22	Ch 7:128254133	C>T	0	1
23	Ch 7:128254138	G>T	0	1

ны как новые, так и ранее описанные однонуклеотидные замены. В исследуемых группах идентифицировано 45 однонуклеотидных замен. У подростков с ожирением выявлены ранее зарегистрированные в GenBank SNP: rs917105894 G>T, rs1795301406 G>A, rs1795303962 G>A, rs1795304377 A>C, rs1795304438 G>T, rs1318987243 G>T,

rs3793162 G>A,C,T, rs1795306653 G>T, rs1795307023 A>G, rs1010492815 A>G, rs1795307445 G>A, rs1795307524 A>G, rs1430150874 G>A. Идентифицированы ранее не зарегистрированные в GenBank SNP: Ch 7:128254131, Ch 7:128254139, Ch 7:128254145, Ch 7:128253548, Ch 7:128253560, Ch 7:128253561, Ch 7:128253565,

ТАБЛИЦА 6
НУКЛЕОТИДНЫЕ ЗАМЕНЫ В ВЫЯВЛЕННЫХ
ПОЛИМОРФИЗМАХ ГЕНА *LEP* У ПОДРОСТКОВ
С РАЗНЫМ СТАТУСОМ ВЕСА

TABLE 6
NUCLEOTIDE SUBSTITUTIONS IN IDENTIFIED *LEP* GENE
POLYMORPHISMS IN ADOLESCENTS WITH DIFFERENT
WEIGHT STATUS

№ п/п	Однонуклеотидный полиморфизм	Зарегистрированная в GenBank нуклеотидная замена	Выявленная нуклеотидная замена
1	rs1795301406	G>A	G>C
2	rs1795303962	G>A	G>T
3	rs1795304377	A>C	A>T
4	rs1795306221	G>A	G> T
5	rs1795306653	G>T	G> T
6	rs1033530971	C>T	C>A
7	rs1795307023	A>G	A>C
8	rs1010492815	A>G	A>T
9	rs188857788	C>A	C>G
10	rs1795307445	G>A	G>C,T
11	rs1795307524	A>G	A>T
12	rs1430150874	G>A	G>T

Ch 7:128253877, Ch 7:128254070, Ch 7:128254084, Ch 7:128254089, Ch 7:128254121, Ch 7:128254133, Ch 7:128254138. Для оценки вклада данных SNP в метаболические нарушения у подростков с избыточной теломассой и ожирением необходимо продолжить данное исследование с расширением изучаемых когорт подростков и последующим анализом клинико-метаболических показателей в указанных выборках.

ВЫВОДЫ

Оптимальные условия для проведения ПЦР для пары праймеров (5-AGCCTTGTTTCATCATCTGGA, 3-TGGGAGGAATCGCTCTCAGA) гена лептина: концентрация праймеров – 0,18 мкМ; отжиг праймеров при температуре 60 °С. По результатам секвенирования гена *LEP* идентифицировано 12 новых нуклеотидных замен в ранее зарегистрированных в GenBank SNP. В анализируемом фрагменте интрона гена лептина (5-AGCCTTGTTTCATCATCTGGA, 3-TGGGAGGAATCGCTCTCAGA) впервые идентифицировано 23 SNP.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Mazidi M, Banach M, Kengne AP. Prevalence of childhood and adolescent overweight and obesity in Asian countries: A systematic review and meta-analysis. *Arch Med Sci*. 2018; 14(6): 1185-1203. doi: 10.5114/aoms.2018.79001
- Choquet H, Meyre D. Genomic insights into early-onset obesity. *Genome Med*. 2010; 2(6): 36. doi: 10.1186/gm157
- Bell CJ, Walley AJ, Froguel P. The genetics of human obesity. *Nat Rev Genet*. 2005; 6(3): 221-234. doi: 10.1038/nrg1556
- Jin X, Qiu T, Li L, Yu R, Chen X, Li C, et al. Pathophysiology of obesity and its associated diseases. *Acta Pharm Sin B*. 2023; 13(6): 2403-2424. doi: 10.1016/j.apsb.2023.01.012
- Бальжиева В.В., Баирова Т.А., Рычкова Л.В., Аюрова Ж.Г., Колесников С.И. Этногенетические аспекты ожирения у детей и подростков. *Вопросы детской диетологии*. 2017; 15(5): 29-34. [Balzhieva VV, Bairova TA, Rychkova LV, Ayurova ZhG, Kolesnikov SI. Ethnogenetic aspects of obesity in children and adolescents. *Pediatric Nutrition*. 2017; 15(5): 29-34. (In Russ.)].
- Колесникова Л.И., Рычкова Л.В., Колесников С.И., Даренская М.А., Гаврилова О.А., Кравцова О.В., и др. Оценка системы липопероксидации и антиоксидантной защиты у мальчиков-подростков с экзогенно-конституциональным ожирением с использованием коэффициента окислительного стресса. *Вопросы питания*. 2018; 87(1): 28-34. [Kolesnikova LI, Rychkova LV, Kolesnikov SI, Darenskaya MA, Gavrilova OA, Kravtsova OV, et al. The evaluation of the lipid peroxidation system and antioxidant

defense in adolescent boys with exogenously constitutive obesity with using the coefficient of oxidative stress. *Problems of Nutrition*. 2018; 87(1): 28-34. (In Russ.).

7. Darenskaya MA, Kolesnikova LI, Rychkova LV, Kravtsova OV, Semenova NV, Kolesnikov SI. Relationship between lipid metabolism state, lipid peroxidation and antioxidant defense system in girls with constitutional obesity. *AIMS Molecular Science*. 2021; 8(2): 117-126.

8. Lee GH, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JI, et al. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature*. 1996. 379(6566): 632-635. doi: 10.1038/379632a0

9. Piqueras P, Ballester A, Durá-Gil JV, Martínez-Hervas S, Redón J, Real JT. Anthropometric indicators as a tool for diagnosis of obesity and other health risk factors: A literature review. *Front Psychol*. 2021; 12: 631179. doi: 10.3389/fpsyg.2021.631179

10. Obradovic M, Sudar-Milovanovic E, Soskic S, Essack M, Arya S, Stewart AJ, et al. Leptin and obesity: Role and clinical implication. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021; 12: 585887. doi: 10.3389/fendo.2021.585887

11. Luis de DA, Perez Castrillón JL, Dueñas A. Leptin and obesity. *Minerva Med*. 2009; 100(3): 229-236.

12. Isse N, Ogawa Y, Tamura N, Masuzaki H, Mori K, Okazaki T, et al. Structural organization and chromosomal assignment of the human obese gene. *J Biol Chem*. 1995; 270(46): 27728-327733. doi: 10.1074/jbc.270.46.27728

13. National Library of Medicine. *SNP links for gene (select 3952)*. URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?LinkName=gene_snp&from_uid=3952 [date of access: 03.07.2023].

14. Rychkova L, Bairova T, Ievleva K, Balzhieva V, Rashidova M, Kolesnikova L. *LEP rs2167270* and plasma leptin level in adolescents with overweight and obesity. *European Journal of Preventive Cardiology*. 2018; 25(2): 18-54.

15. Дедов И.И., Петеркова В.А. (ред.). *Федеральные клинические рекомендации (протоколы) по ведению детей с эндокринными заболеваниями*. М.: Практика; 2014. [Dedov II, Peterkova VA (eds). *Federal clinical guidelines (protocols) for the management of children with endocrine diseases*. Moscow: Pratika; 2014. (In Russ.)].

16. Ожирение и избыточный вес. *Информационный бюллетень ВОЗ*. 2021. [Obesity and overweight. *World Health Organization Fact Sheet*. 2021. (In Russ.)]. URL: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> [date of access: 03.07.2023]

17. National Library of Medicine. *Basic local alignment search tool*. URL: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> [date of access: 03.07.2023].

18. National Library of Medicine. *Homo sapiens leptin (LEP), RefSeqGene on chromosome 7*. URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NG_007450.1?report=graph [date of access: 03.07.2023].

19. Thermo Fisher Scientific. *T_m calculator*. URL: <https://www.thermofisher.com>. [date of access: 03.07.2023].

Сведения об авторах

Байрова Татьяна Ананьевна – доктор медицинских наук, заведующая лабораторией персонализированной медицины, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: tbairova38@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3704-830X>

Ершова Оксана Александровна – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории персонализированной медицины, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: oksana111088@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0690-4636>

Самбялова Александра Юрьевна – младший научный сотрудник лаборатории персонализированной медицины, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: sambialova95@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5790-6282>

Беляева Елена Владимировна – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории персонализированной медицины, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: belyeva_irk@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6050-5287>

Рычкова Любовь Владимировна – доктор медицинских наук, член-корреспондент РАН, директор, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: iph@sbamsr.irk.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0117-2563>

Синьков Вячеслав Владимирович – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории эпидемиологически и социально-значимых инфекций, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: vsinkov@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-3396-9590>

Information about the authors

Tatyana A. Bairova – Dr. Sc. (Med.), Head of the Laboratory of Personalized Medicine, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: tbairova38@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3704-830X>

Oksana A. Ershova – Cand. Sc. (Biol.), Research Officer at the Laboratory of Personalized Medicine, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: oksana111088@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0690-4636>

Alexandra Yu. Sambyalova – Junior Research Officer at the Laboratory of Personalized Medicine, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: sambialova95@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5790-6282>

Elena V. Belyaeva – Cand. Sc. (Biol.), Research Officer at the Laboratory of Personalized Medicine, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: belyeva_irk@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6050-5287>

Lyubov V. Rychkova – Dr. Sc. (Med.), Corresponding Member of the RAS, Director, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: iph@sbamsr.irk.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0117-2563>

Viacheslav V. Sinkov – Cand. Sc. (Med.), Senior Research Officer at the Laboratory of Epidemiologically and Socially Significant Infections, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: vsinkov@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-3396-9590>