

АНАЛИЗ АССОЦИАЦИИ RS9536314 ГЕНА *KL*
С АНТРОПОМЕТРИЧЕСКИМИ И БИОХИМИЧЕСКИМИ ПОКАЗАТЕЛЯМИ
У МУЖЧИН Г. НОВОСИБИРСКА (ЗАПАДНАЯ СИБИРЬ)

О.В. Тимощенко, С.Е. Семаев, Д.Е. Иванощук, Е.М. Стахнёва, Ю.П. Никитин,
Е.В. Шахтшнейдер, Ю.И. Рагино

*НИИ терапии и профилактической медицины –
филиал ФГБУ ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН
630089, г. Новосибирск, ул. Бориса Богаткова, 175/1*

Цель исследования – определить частоту полиморфизма rs9536314 (F325V) гена *KL* и ассоциацию данного варианта с рядом биохимических и антропометрических показателей у мужчин исследуемой группы и в европеоидной популяции Западной Сибири. **Материал и методы.** Исследуемая группа (69 мужчин, средний возраст $61,2 \pm 11,5$ года) сформирована случайным образом из выборки лиц, обратившихся в клинику и поликлинику НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН и ГБУЗ НСО Госпиталь ветеранов войн № 3 (178 мужчин, в возрасте 50–65 лет и старше 80 лет). Популяционная группа была случайным образом отобрана (219 человек) из выборки, опрошенной в рамках Международного многоцентрового проекта «Факторы риска сердечно-сосудистых заболеваний в Восточной Европе» HAPIEE (9360 участников, 45–69 лет, средний возраст $53,8 \pm 7$ лет, европеоиды > 90 %). Биохимические показатели определяли стандартными энзиматическими методами. Концентрацию в сыворотке крови белка Клото измеряли с помощью иммуноферментного метода. Геномную ДНК амплифицировали с помощью полимеразной цепной реакции в стандартной реакционной смеси и далее гидролизировали рестриктазой TaqI B. **Результаты.** Частота генотипов (TT, TG и GG) и аллелей (T и G) rs9536314 гена *KL* в исследуемой группе соответствует данным в популяции Западной Сибири, а также в популяции Западной и Восточной Европы. Статистически значимых различий клинико-биохимических параметров в зависимости от генотипов rs9536314 гена *KL* в исследуемой группе и в популяции не выявлено. В исследуемой группе уровень белка Клото в крови и скорость клубочковой фильтрации у мужчин с ишемической болезнью сердца и артериальной гипертензией не различаются в аутосомно-доминантной и аутосомно-рецессивной моделях для rs9536314 гена *KL*. **Заключение.** Частота полиморфизма rs9536314 гена *KL* в исследуемой группе соответствует частоте полиморфизма rs9536314 гена *KL* в европеоидной популяции Западной Сибири. Биохимические и антропометрические показатели, а также содержание белка Клото не имеют статистически значимых различий в зависимости от генотипов rs9536314 гена *KL* у обследованных мужчин.

Ключевые слова: ген Клото, rs9536314, ишемическая болезнь сердца, популяция Западной Сибири.

Тимощенко Ольга Владимировна – н.с. лаборатории молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний, e-mail: lentis@yandex.ru

Семаев Сергей Евгеньевич – н.с. лаборатории молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний, e-mail: sse85@ngs.ru

Иванощук Динара Евгеньевна – н.с. лаборатории молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний, e-mail: dinara2084@mail.ru

Стахнёва Екатерина Михайловна – канд. биол. наук, с.н.с. лаборатории клинических биохимических и гормональных исследований терапевтических заболеваний, e-mail: stahneva@yandex.ru

Никитин Юрий Петрович – д-р мед. наук, проф., академик РАН, рук. сектора аналитико-методологических проблем терапевтических заболеваний, e-mail: yuri-nikitin@ngs.ru

Шахтшнейдер Елена Владимировна – канд. мед. наук, в.н.с. лаборатории молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний, e-mail: 2117409@mail.ru

Рагино Юлия Игоревна – д-р мед. наук, проф., чл.-корр. РАН, рук., e-mail: ragino@mail.ru

ВВЕДЕНИЕ

Ген *KL* (*Klotho gene*, ID 9365) впервые выделен в 1997 г. у трансгенных мышей [1]. В 1998 г. Y. Matsumura et al. идентифицировали ген *KL* у человека [2]. Он находится в хромосомной области 13q13.1, состоит из шести экзонов и кодирует мембранный белок типа I, связанный с бета-глюкозидазами (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9365>). Белок Клото преимущественно экспрессируется в дистальных извитых канальцах почек, в более низких концентрациях определяется в эпителиальных клетках сосудистого сплетения в головном мозге, сердце, сосудистой стенке, паращитовидной железе, плаценте, тонком кишечнике, простате и других тканях [3, 4].

Согласно данным литературы, кодируемый геном *KL* белок влияет на продолжительность жизни мышей [1] и, возможно, человека [5]. Пациенты пожилого возраста с более высокими концентрациями протеина в плазме, как правило, демонстрируют меньшее снижение когнитивных функций с возрастом по стандартизированным когнитивным тестам [6]; выраженный стресс, как правило, сопровождается уменьшением уровня белка Клото [7]. Трансгенные мыши, выведенные с целью иметь избыток предшественника амилоида человека (для имитации болезни Альцгеймера), получают более высокие результаты в некоторых функциональных тестах, когда содержание в их крови белка Клото увеличивается [8].

Активное отложение фосфата кальция в стенках сосудов, приводящее к их кальцификации, обычно наблюдается при старении, сахарном диабете и хроническом заболевании почек. Этот процесс опосредуется различными типами клеток, включая сосудистые стволовые клетки / клетки-предшественники с потенциалом остеогенной дифференцировки, прямое воздействие на которые антивозрастного белка Клото может способствовать ингибированию кальцификации сосудов. Лучшее понимание возможных эффектов белка Клото на сосудистые стволовые клетки / клетки-предшественники может дать новое понимание клеточных и молекулярных механизмов кальцификации сосудов и заболеваний, связанных с его дефицитом. Белок Клото можно рассматривать как многообещающее терапевтическое средство для лечения кальцификации сосудов и связанных с ней заболеваний.

У человека выявлено более 500 полиморфных вариантов в этом гене. Ряд исследований показал ассоциацию вариантов в гене *KL* с заболеваниями и процессами старения [9].

Rs9536314 (с.1062T>G, p.Phe352Val, F352V) вместе с rs9527025 (C370S) ко-сегрегируется в

гаплотип KL-VS, который увеличивает секрецию белка Клото и может изменять его функции; альтернативный гаплотип назван KL-FC. Аллель KL-VS влияет на метаболизм и активность белка Клото, вносит вклад в возрастные фенотипы человека и связан с сокращением продолжительности жизни в гомозиготном варианте [5, 10–13]. Также этот аллель влияет на интеллект и когнитивные способности [10, 11]. Гетерозиготность KL-VS (но не гомозиготность) связана с большим объемом коры головного мозга [14]. Стоит отметить, что KL-VS может быть маркером повышенного риска развития сердечно-сосудистых заболеваний [13, 15]. Исследователи подчеркивают важность этого полиморфизма в отношении возникновения ишемической болезни сердца (ИБС) с ранним началом. Более того, гаплотип KL-VS ассоциирован с повышением уровня сывороточных липопротеинов высокой плотности, систолического артериального давления и риска инсульта. Это подтверждает гипотезу о связи белка Клото с атеросклерозом [13, 15]. Отмечается возможная ассоциация F352V с развитием онкологических заболеваний [16].

При анализе с использованием программно-обеспечения прогнозирования структуры белка PolyPhen-2 [17] для варианта rs9536314 (F352V) показана высокая вероятность повреждающего действия на белковый продукт. Цель исследования — определить частоту полиморфизма rs9536314 (F325V) гена *KL* и ассоциацию данного варианта с рядом биохимических и антропометрических показателей у мужчин исследуемой группы и в европеоидной популяции Западной Сибири.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено в НИИ терапии и профилактической медицины — филиале ФГБУ ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН (НИИТПМ — филиал ИЦиГ СО РАН), на участие в нем все пациенты подписали информированное согласие. Протокол исследования одобрен этическим комитетом НИИТПМ — филиал ИЦиГ СО РАН.

В период с 2016 по 2018 г. было отобрано 178 пациентов мужского пола в возрасте 50–65 лет и старше 80 лет, обратившихся в клинику и поликлинику НИИТПМ — филиал ИЦиГ СО РАН и ГБУЗ НСО Госпиталь ветеранов войн № 3. С помощью метода случайных чисел для молекулярно-генетического исследования в основную выборку вошли 69 человек (основная группа, средний возраст $61,2 \pm 11,5$ года). В рамках исследования пациентам проведено клини-

ческое обследование, измерены артериальное давление (АД) и частота сердечных сокращений (ЧСС), проведена антропометрия (рост, вес, окружность талии (ОТ) и бедер (ОБ)), рассчитаны индекс массы тела (ИМТ) и соотношение ОТ/ОБ, оценены биохимические показатели (содержание общего холестерина (ОХС), триглицеридов (ТГ), холестерина липопротеинов высокой плотности (ХС ЛПВП), глюкозы, креатинина). Забор крови из локтевой вены для проведения биохимических тестов осуществляли утром натощак (не менее чем через 12 ч после последнего приема пищи). Рассчитаны скорость клубочковой фильтрации (СКФ) по формуле СКД-ЕРІ, содержание ХС липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) по формуле Фридвальда ($\text{ХС ЛПНП (мг/дл)} = \text{ОХС} - \text{ХС ЛПВП} - \text{ТГ}/5$), уровень ХС не-ЛПВП по формуле $\text{ХС не-ЛПВП} = \text{ОХС} - \text{ХС ЛПВП}$, коэффициент атерогенности по формуле $(\text{ОХС} - \text{ХС ЛПВП})/\text{ХС ЛПВП}$. Концентрация в сыворотке крови белка Клото измерена на фотометре с помощью иммуноферментного метода с использованием набора согласно инструкции изготовителя (Human Klotho ELISA Kit, Wuhan Fine Biotech Co., Китай).

Популяционная группа сформирована в рамках одномоментного эпидемиологического обследования взрослого населения в г. Новосибирске (Западная Сибирь, Россия). Из жителей г. Новосибирска, обследованных в период 2007–2008 гг. на скрининге в рамках Международного многоцентрового проекта «Факторы риска сердечно-сосудистых заболеваний в Восточной Европе» HAPIEE [18], с помощью таблицы случайных чисел сформирована основная репрезентативная выборка (9360 человек, 45–69 лет, средний возраст $53,8 \pm 7,0$ года, европеоидов > 90 %). Программа обследования: регистрация социально-демографических данных; клиническое обследование; стандартный опросник по курению; антропометрия (рост, масса тела, ОТ); измерение АД; исследование биохимических показателей сыворотки крови (содержание ОХС, ХС ЛПВП, ТГ, глюкозы натощак). Забор крови из локтевой вены проводили утром натощак и через 12 ч после приема пищи. Показатели липидного профиля крови (ОХС, ТГ, ХС ЛПВП, ХС ЛПНП) измеряли энзиматическими методами с использованием стандартных реактивов Biocon Fluitest (Германия) на биохимическом анализаторе Labsystem FP-901 (Финляндия). Для молекулярно-генетического исследования из основной выборки методом случайных чисел отобраны 219 человек.

Для выделения ДНК из крови использовали метод фенол-хлороформной экстракции [19].

Полиморфизм F325V гена *KL* анализировали по стандартной методике (использованные праймеры: 5'-accg-acca-cagc-atca-aaga-3' и 5'-atga-actt-ttc-cag-attc-agtc-g-3''). Геномную ДНК амплифицировали с помощью полимеразной цепной реакции в стандартной реакционной смеси и далее гидролизовали рестриктазой TaqI В. Визуализацию продуктов рестрикции проводили методом гель-электрофореза в 5%-м полиакриламидном геле с последующей окраской бромистым этидием и сканированием геля с помощью системы компьютерной видеосъемки.

Значимость различий в частотах аллелей между исследуемыми подгруппами и соответствие равновесию Харди – Вайнберга определяли с помощью критерия χ^2 . Оценку различий средних значений количественных показателей между разными генотипами проводили после стандартизации по полу, возрасту и индексу массы тела в модели «GLM» лицензионного пакета статистических программ SPSS for Windows. Полученные данные в статье представлены как абсолютные (*n*) и относительные величины (%) в виде средней арифметической величины (*M*) и стандартного отклонения (*SD*); медианы (*Me*) и 25-го и 75-го квартилей. Критерием статистической достоверности был уровень $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В исследуемой группе среди 69 мужчин распространенность ИБС (наличие у пациентов стенокардии напряжения, инфаркта миокарда или реваскуляризации коронарных артерий) составила 55,1 %, артериальной гипертонии ($\text{АД} \geq 140/90$ мм рт. ст.) – 75,4 %, сахарного диабета – 5,8 %, дислипидемии ($\text{ОХС} \geq 5,2$ ммоль/л и/или прием статинов) – 73,9 %. Данные клинико-антропометрического и биохимического обследования пациентов представлены в табл. 1.

Частота аллелей и генотипов rs9536314 представлена в табл. 2. По данным gnomAD exome, частота G = 0,14, T = 0,86, по данным TOPMED – соответственно 0,15 и 0,85 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Для rs9536314 в популяции распределение частоты генотипов соответствовало равновесию Харди – Вайнберга ($\chi^2 = 1,7483$). По результатам нашего исследования не получено статистически значимых различий по частоте генотипов (TT, TG и GG) и аллелей (T и G) в исследуемой группе по сравнению с популяцией Западной Сибири, а также с литературными данными для европеоидных популяций Западной и Восточной Европы.

При анализе ассоциации ряда клинико-биохимических показателей с генотипами rs9536314 гена *KL* у мужчин исследуемой группы и в по-

Таблица 1

Клинико-антропометрическая и биохимическая характеристика пациентов исследуемой группы и лиц европеоидной популяции Западной Сибири ($M \pm SD$)

Показатель	Исследуемая группа, $n = 69$	Популяция		
		Оба пола, $n = 219$	Мужчины, $n = 123$	Женщины, $n = 96$
Средний возраст, лет	61,2±11,5	54,4±6,5	55,1±6,7	53,5±6,1
Систолическое АД, мм рт. ст.	131,0±16,7	141,7±25,7	142,1±23,0	141,1±29,0
Диастолическое АД, мм рт. ст.	82,2±12,1	89,9±14,7	89,9±13,6	89,8±16,1
ЧСС, уд/мин	69,5±8,6	70,7±11,0	70,3±11,8	71,1±9,9
ИМТ, кг/м ²	25,9±4,6	28,4±6,0	26,7±4,6	30,7±6,7
ОТ, см	95,6±12,6	93,2±15,9	94,2±15,1	91,9±17,0
ОБ, см	97,9±10,0	104,5±11,4	101,0±7,8	108,8±13,6
ОТ/ОБ	0,98±0,1	0,89±0,1	0,93±0,1	0,85±0,1
Содержание ОХС, моль/л	4,8±1,2	6,0±1,1	5,9±1,1	6,2±1,2
Содержание ХС ЛПНП, моль/л	2,8±1,2	3,0±1,0	3,0±0,9	3,1±1,1
Содержание ХС ЛПВП, моль/л	1,2±0,4	1,5±0,4	1,5±0,4	1,6±0,3
Содержание ТГ, моль/л	1,9±1,4	1,4±0,8	1,3±0,8	1,5±0,5
Коэффициент атерогенности	3,8±2,8	3,1±1,2	3,2±1,2	3,0±1,2
Содержание глюкозы, моль/л	6,2±1,1	5,7±1,5	5,7±1,5	5,8±1,4

Таблица 2

Частота аллелей и генотипов rs9536314

	Исследуемая группа	Популяция		
	Мужчины, %, $n = 69$	Оба пола, %, $n = 219$	Мужчины, %, $n = 123$	Женщины, %, $n = 96$
Генотипы				
TT	0,68 $n = 47$	0,67 $n = 147$	0,62 $n = 76$	0,74 $n = 71$
TG	0,28 $n = 19$	0,29 $n = 63$	0,33 $n = 41$	0,23 $n = 22$
GG	0,04 $n = 3$	0,04 $n = 9$	0,05 $n = 6$	0,03 $n = 3$
Аллели				
T	0,82	0,82	0,78	0,85
G	0,18	0,18	0,22	0,15

пуляции не получены статистически значимые ассоциации величины систолического и диастолического АД, ЧСС, ИМТ, ОТ, ОБ, ОТ/ОБ, содержания ОХС, ХС ЛПНП, ХС ЛПВП, ТГ, глюкозы и коэффициента атерогенности в зависимости от изучаемых генотипов (табл. 3).

Выполнен анализ медианы белка Клото и средних значений СКФ у мужчин с ИБС и АГ в исследуемой группе в аутосомно-доминантной (TT+TG) и аутосомно-рецессивной (TG+GG) моделях для rs9536314 гена *KL*, различий не обнаружено (табл. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами показано наличие тенденции к уменьшению уровня белка Клото в крови мужчин с ИБС по сравнению с мужчинами без нее (соответственно 444 [229; 683] и 524 [259; 1064] пг/дл, $p = 0,243$) [20]. Содержание белка Клото в крови мужчин с артериальной гипертензией и без нее одинаково (соответственно 464 [287; 849] и 458 [128; 1121] пг/дл, $p = 0,919$) и не зависит от возраста, но снижено при наличии ожирения, низкой физической активности

Таблица 3

Клинико-биохимические показатели у мужчин исследуемой группы и в популяции (M± SD)

Показатель	Исследуемая группа, n = 69				Оба пола, n = 219				Популяция				Женщины, n = 96			
	ТТ	TG	GG	p	ТТ	TG	GG	p	ТТ	TG	GG	p	ТТ	TG	GG	p
Генотип	129,7± 17,7	135,8± 14,2	120,0± 10,0	0,449	141,7± 26,2	141,6± 6,3	142,3± 13,2	0,752	142,7± 24,9	140,9± 20,8	143,2± 9,1	0,843	140,6± 27,5	142,8± 34,9	140,6± 22,1	0,696
Систолическое АД, мм рт. ст.	81,6± 13,2	85,0±9,4	89,3±5,8	0,775	89,9± 15,0	89,6± 14,8	91,3± 9,5	0,916	89,7± 14,5	89,9± 12,9	92,2± 4,7	0,917	90,1± 15,7	89,1± 18,1	89,6± 17,4	0,981
Диастолическое АД, мм рт. ст.	68,7± 7,9	70,0±8,0	79,3± 18,6	0,116	70,8± 9,9	70,9± 13,2	66,7± 10,1	0,544	71,0± 10,4	70,0± 14,1	64,1± 10,7	0,361	70,6± 9,5	72,47± 11,7	72,0± 8,0	0,728
ЧСС, уд/мин	25,8± 4,8	26,7±4,3	21,7±2,3	0,648	28,7± 6,0	27,6± 5,8	29,7± 6,7	0,548	26,8± 4,6	26,5± 4,8	26,5± 4,6	0,933	30,8± 6,7	29,7± 6,9	36,0± 5,9	0,314
ИМТ, кг/м²	95,2± 13,5	98,3±9,8	84,3±8,5	0,609	93,9± 16,9	91,2± 13,5	95,6± 15,3	0,446	95,1± 16,0	92,7± 13,4	93,1± 14,7	0,694	92,6± 17,9	88,7± 13,6	100,5± 18,6	0,434
ОТ, см	96,4± 10,1	103,1± 8,4	89,3± 5,0	0,059	104,6± 11,6	107,4± 10,0	110,3± 15,4	0,286	101,1± 7,8	100,8± 7,8	102,8± 8,9	0,918	108,4± 13,6	108,1± 12,4	125,2± 15,6	0,160
ОБ, см	0,99± 0,1	0,96±0,1	0,94±0,1	0,368	0,89± 0,5	0,88± 0,1	0,87± 0,1	0,310	0,94± 0,1	0,92± 0,1	0,9± 0,8	0,556	0,85± 0,1	0,82± 0,1	0,8± 0,1	0,575
ОТ/ОБ	4,9± 1,2	4,6±1,1	4,1±1,4	0,541	6,0± 1,1	6,0± 1,1	6,4±0,6	0,332	5,8±1,1	5,9±1,0	6,3±0,6	0,533	6,1± 1,2	6,1± 1,3	6,7± 0,8	0,587
Содержание ОХС, моль/л	2,9± 1,2	2,7±1,1	1,9±0,9	0,544	3,0± 1,0	3,0± 1,1	3,3±0,9	0,574	3,0±1,0	3,0±1,0	3,3±0,9	0,845	3,0± 1,0	3,0± 1,2	3,6± 1,0	0,547
Содержание ХС ЛПНП, моль/л	1,2± 0,4	1,1±0,3	1,7±0,7	0,348	1,5± 0,4	1,5± 0,4	1,6±0,4	0,5	1,5±0,4	1,5±0,4	1,5±0,4	0,893	1,5± 0,6	1,7± 0,4	1,7± 0,4	0,185
Содержание ХС ЛПВП, моль/л	1,9± 1,6	1,8±1,0	1,1±0,7	0,872	1,4± 0,6	1,4± 0,8	3,5±0,8	0,914	1,3± 0,6	1,4± 0,9	1,6± 0,9	0,512	1,5± 0,6	1,3±0,4	1,4± 0,6	0,383
Содержание ТГ, моль/л	4,0± 3,0	3,5±2,0	1,6±1,2	0,508	3,1± 1,2	3,0± 1,1	3,3±1,1	0,788	3,2± 1,3	3,2± 0,9	3,4± 1,3	0,963	3,1±1,2	2,8± 1,2	3,0± 0,5	0,656
Коэффициент атерогенности	6,3± 1,1	6,0±0,8	6,5±1,9	0,537	5,7± 1,4	5,9± 1,7	5,5±0,5	0,630	5,7± 1,5	5,9± 1,7	5,4± 0,5	0,670	5,8±1,3	5,9± 1,9	5,5± 0,5	0,809

Таблица 4

Средние значения клинико-биохимических показателей между аутосомно-доминантной и аутосомно-рецессивной моделями rs9536314 у мужчин исследуемой группы

Нозология	Показатель	Генотип				p
		TT+TG		TG+GG		
Ишемическая болезнь сердца, n = 38	СКФ, мл/мин/1,73 см ² (M±SD)	n = 37	85,1±15,1	n = 15	85,2±15,3	0,970
	Белок Клото, пг/мл Ме [25; 75]		544 [409; 976]		471 [315; 973]	0,327
Артериальная гипертензия, n = 52	СКФ, мл/мин/1,73 см ² (M±SD)	n = 51	83,4±16,8	n = 15	85,9±15,9	0,758
	Белок Клото, пг/мл Ме [25; 75]		673 [428; 1045]		603 [315; 978]	0,359

и сахарного диабета в 1,3, 2,2 и 1,4 раза соответственно [21].

Выявление модифицируемых факторов, которые, как известно, влияют на риск, связанный с гаплотипом KL-VS (rs9536314 и rs9527025), представляет особый интерес, поскольку эти факторы могут объяснить механизм, с помощью которого белок Клото влияет на риск атерогенной ИБС и позволяет предложить продуктивные стратегии терапевтического вмешательства. В исследовании D.E. Arking et al., в котором принимали участие здоровые или предположительно здоровые сиблинги пациентов с ранним началом ИБС (<60 лет), показано, что уровень АД и ХС ЛПВП значительно изменили риск, связанный со статусом гаплотипа KL-VS. Нормотензивные носители KL-VS продемонстрировали большее увеличение риска скрытого атеросклероза, чем носители гипертонической болезни [13]. Экспериментальные данные, полученные на моделях крыс, демонстрируют, что содержание белка Клото уменьшается в условиях гипертонии [22, 23] под действием ангиотензина II [24]. Таким образом, было выдвинуто предположение, что уровень белка Клото, вероятно, будет снижен у лиц с гипертонией, что может маскировать негативное влияние гаплотипа KL-VS. Эта гипотеза также поднимает вопрос о том, может ли повышение концентрации ангиотензина II как независимого фактора риска сердечно-сосудистых заболеваний [25, 26] быть вызвано, по крайней мере частично, падением уровня белка Клото. В нашем исследовании содержание белка Клото в крови мужчин с артериальной гипертонией не зависело от генотипа.

Считается, что белок Клото защищает сердечно-сосудистую систему посредством увеличения продукции эндотелием оксида азота, а гаплотип KL-VS может увеличить риск скрытой ИБС, по крайней мере частично, из-за сниже-

ния генерации NO [23, 27–29]. Таким образом, в свете данных о том, что ХС ЛПВП активирует эндотелиальную синтазу оксида азота и увеличивает экспрессию NO [30, 31], особенно интересно, что повышение содержания ХС ЛПВП специфически защищает от негативного эффекта, связанного с гаплотипом KL-VS. Эти данные согласуются с моделью, которая предполагает противоположное влияние дефицита белка Клото и увеличения концентрации ХС ЛПВП на продукцию оксида азота и конечный риск ИБС. Таким образом, повышается вероятность того, что использование лекарств, таких как статины или ниацин, для повышения уровня ХС ЛПВП может оказаться особенно эффективным в профилактике ИБС у носителей KL-VS, и что такое вмешательство может быть полезным даже для людей с нормальным уровнем ХС ЛПВП [13].

Данное исследование имеет ряд ограничений. Мы рассмотрели только rs9536314 из гаплотипа KL-VS. Кроме того, размер исследуемой группы составил 69 человек, тогда как в исследовании D.E. Arking et al., где была показана связь риска скрытого атеросклероза и ИБС с гаплотипом KL-VS, численность обследованных составила 520 человек [13]. Перспективно проведение дальнейших исследований как rs9536314, так и гаплотипа KL-VS в большей по размеру выборке.

Изучение генетических факторов риска развития ССЗ важно не только для анализа исходов заболевания, но и для проведения профилактики, учитывая, что определить генетическую вариабельность можно до развития первых клинических проявлений заболевания. Пациенты с высоким генетическим риском могут получить дополнительную мотивацию приверженности здоровому образу жизни. Также информация о генетических факторах риска заболевания может быть использована для улучшения клинического ведения пациентов.

ВЫВОДЫ

1. Частота генотипов (ТТ, ТG и GG) и аллелей (Т и G) rs9536314 гена *KL* в исследуемой группе соответствует данным в популяции Западной Сибири, а также литературным данным для европеоидных популяций Западной и Восточной Европы.

2. Статистически значимых различий величин изученных клинико-биохимических параметров в зависимости от генотипов rs9536314 гена *KL* в исследуемой группе и в популяции не выявлено.

3. В исследуемой группе уровень белка Клото в крови и СКФ у мужчин с ИБС и артериальной гипертензией не различаются в аутосомно-доминантной и аутосомно-рецессивной моделях для rs9536314 гена *KL*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, частота полиморфизма rs9536314 гена *KL* в исследуемой группе соответствует частоте полиморфизма rs9536314 гена *KL* в европеоидной популяции Западной Сибири. Биохимические и антропометрические показатели, а также содержание белка Клото не имеют статистически значимых различий в зависимости от генотипов rs9536314 гена *KL* у обследованных мужчин.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа по формированию выборки и клинико-биохимические исследования выполнены в рамках государственного задания № АААА-А17-117112850280-2, молекулярно-генетический анализ выполнен при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации для ведущих научных школ № НШ-2595.2020.7.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kuro-o M., Matsumura Y., Aizawa H., Kawaguchi H., Suga T., Utsugi T., Ohshima Y., Kurabayashi M., Kaname T., Kume E., Iwasaki H., Iida A., Shiraki-Iida T., Nishikawa S., Nagai R., Nabeshima Y.I. Mutation of the mouse Klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature*, 1997; 390 (6655): 45–51. doi: 10.1038/36285
2. Matsumura Y., Aizawa H., Shiraki-Iida T. Nagai R., Kuro-o M., Nabeshima Y. Identification of the human Klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted Klotho protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1998; 242 (3): 626–630. doi: 10.1006/bbrc.1997.8019
3. Kurosu H., Yamamoto M., Clark J.D., Pastor J.V., Nandi A., Gurnani P., McGuinness O.P., Chikuda H., Yamaguchi M., Kawaguchi H., Shimomura I., Takayama Y., Herz J., Kahn C.R., Rosenblatt K.P., Kuro-o M. Suppression of aging in mice by the hormone Klotho. *Science*, 2005; 309 (5742), 1829–1833. doi: 10.1126/science.1112766
4. Li S.A., Watanabe M., Yamada H., Nagai A., Kinuta M., Takei K. Immunohistochemical localization of Klotho protein in brain, kidney, and reproductive organs of mice. *Cell Struct. Funct.*, 2004; 29 (4): 91–99. doi: 10.1247/csf.29.91
5. Arking D.E., Kresova A., Macek M.Sr., Macek M.Jr., Arking A., Mian I.S., Fried L., Hamosh A., Dey S., McIntosh I., Dietz H.C. Association of human aging with a functional variant of Klotho. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002; 99 (2): 856–861. doi: 10.1073/pnas.022484299
6. Shardell M., Semba R.D., Rosano C., Kalyani R.R., Bandinelli S., Chia C.W. L plasma Klotho and cognitive decline in older adults: findings from the InCHIANTI study. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.*, 2016; 71 (5): 677–682. doi: 10.1093/gerona/glv140
7. Prather A.A., Epel E.S., Arenander J., Broestl L., Garay B.I., Wang D., Dubal D.B. Longevity factor klotho and chronic psychological stress. *Transl. Psychiatry*, 2015; 5 (6): e585. doi: 10.1038/tp.2015.81
8. Dubal D.B., Zhu L., Sanchez P.E., Worden K., Broestl L., Johnson E., Ho K., Yu G.Q., Kim D., Betourne A., Kuro-O M., Maslah E., Abraham C.R., Mucke L. Life extension factor Klotho prevents mortality and enhances cognition in hAPP transgenic mice. *J. Neurosci.*, 2015; 35 (6): 2358–2371. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5791-12.2015
9. Abulizi P., Zhou X.-H., Keyimu K., Luo M., Jin F.-Q. Correlation between Klotho gene and mild cognitive impairment in the Uygur and Han populations of Xinjiang. *Oncotarget*, 2017; 8 (43): 75174–75185. doi: 10.18632/oncotarget.20655
10. Deary I.J., Harris S.E., Fox H.C., Hayward C., Wright A.F., Starr J.M., Whalley L.J. Klotho genotype and cognitive ability in childhood and old age in the same individuals. *Neurosci. Lett.*, 2005; 378 (1): 22–27. doi: 10.1016/j.neulet.2004.12.005
11. Mengel-From J., Soerensen M., Nygaard M., McGue M., Christensen K., Christiansen L. Genetic variants in Klotho associate with cognitive function in the oldest old group. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.*, 2016; 71 (9): 1151–1159. doi: 10.1093/gerona/glv163
12. Marchelek-Myśliwiec M., Rózański J., Ogrodowczyk A., Dutkiewicz G., Dołęgowska B., Salata D., Budkowska M., Safranow K., Stępniewska J., Wiśniewska M., Ciechanowski K. The association of the Klotho polymorphism rs9536314 with parameters of calcium-phosphate metabolism in patients on long-term hemodialysis. *Ren. Fail.*, 2016; 38 (5): 776–780. doi: 10.3109/0886022X.2016.1162062
13. Arking D.E., Becker D.M., Yanek L.R., Fallin D., Judge D.P., Moy T.F., Becker L.C., Dietz H.C. Klotho allele status and the risk of early-onset occult coronary artery disease. *Am. J. Hum. Genet.*, 2003; 72 (5): 1154–1161. doi: 10.1086/375035
14. Yokoyama J.S., Sturm V.E., Bonham L.W., Klein E., Arfanakis K., Yu L., Coppola G., Kramer J.H., Bennett D.A., Miller B.L., Dubal D.B. Variation in longevity gene Klotho is associated with greater cortical volumes. *Ann. Clin. Transl. Neurol.*, 2015; 2 (3): 215–230. doi: 10.1002/acn3.161

15. Arking D.E., Atzmon G., Arking A., Barzilai N., Dietz H.C. Association between a functional variant of the Klotho gene and high-density lipoprotein cholesterol, blood pressure, stroke, and longevity. *Circ. Res.*, 2005; 96 (4): 412–418. doi: 10.1161/01.RES.0000157171.04054.30
16. Zhu Z., Xia W., Cui Y., Zeng F., Li Y., Yang Z., Hequn C. Klotho gene polymorphisms are associated with healthy aging and longevity: Evidence from a meta-analysis. *Mech. Ageing Dev.*, 2019; 178: 33–40. doi:10.1016/j.mad.2018.12.003
17. Adzhubei I.A., Schmidt S., Peshkin L., Ramensky V.E., Gerasimova A., Bork P., Kondrashov A.S., Sunyaev S.R. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat. Methods*, 2010; 7 (4): 248–249. doi: 10.1038/nmeth0410-248
18. Peasey A., Bobak M., Kubinova R., Malyutina S.K., Pajak A., Tamosiunas A., Pikhart H., Nicholson A., Marmot M. Determinants of cardiovascular disease and other non-communicable diseases in Central and Eastern Europe: Rationale and Design of the HAPIEE study. *BMC Public Health*, 2006; (6): 255–264. doi: 10.1186/1471-2458-6-255
19. Sambrook J., Russell D.W. Purification of nucleic acids by extraction with phenol:chloroform. *CSH Protoc.* 2006; (1): pdb.prot4455. doi: 10.1101/pdb.prot4455
20. Тимошенко О.В., Рагино Ю.И., Стахнёва Е.М., Каштанова Е.В., Никитин Ю.П. Белок Клото в крови у мужчин с ишемической болезнью сердца и его ассоциации с липидным профилем. *Атеросклероз*, 2020; 16 (1): 5–8. doi.org/10.15372/ATER20200101
21. Тимошенко О.В., Стахнёва Е.М., Рагино Ю.И., Никитин Ю.П. Особенности содержания белка Клото в крови у мужчин с артериальной гипертензией и его ассоциации с кардиометаболическими факторами риска. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний*, 2020; 9 (4): 21–31. <https://doi.org/10.17802/2306-1278-2020-9-4-21-31>
22. Aizawa H., Saito Y., Nakamura T., Inoue M., Imanari T., Ohyama Y., Matsumura Y., Masuda H., Oba S., Mise N., Kimura K., Hasegawa A., Kurabayashi M., Kuro-o M., Nabeshima Y., Nagai R. Downregulation of the Klotho gene in the kidney under sustained circulatory stress in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1998; 249 (3): 865–871. doi: 10.1006/bbrc.1998.9246
23. Nagai R., Saito Y., Ohyama Y., Aizawa H., Suga T., Nakamura T., Kurabayashi M., Kuroo M. Endothelial dysfunction in the Klotho mouse and downregulation of klotho gene expression in various animal models of vascular and metabolic diseases. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2000; 57 (5): 738–746. doi: 10.1007/s000180050038
24. Mitani H., Ishizaka N., Aizawa T., Ohno M., Usui S., Suzuki T., Amaki T., Mori I., Nakamura Y., Sato M., Nangaku M., Hirata Y., Nagai R. In vivo Klotho gene transfer ameliorates angiotensin II-induced renal damage. *Hypertension*, 2002; 39 (4): 838–843. doi: 10.1161/01.hyp.0000013734.33441.ea
25. Brunner H.R. Experimental and clinical evidence that angiotensin II is an independent risk factor for cardiovascular disease. *Am. J. Cardiol.*, 2001; 87 (8A): 3C–9C. doi: 10.1016/s0002-9149(01)01538-7
26. Gavras I., Gavras H. Angiotensin II as a cardiovascular risk factor. *J. Hum. Hypertens.*, 2002; 16 (Suppl. 2): S2–S6. doi: 10.1038/sj.jhh.1001392
27. Saito Y., Yamagishi T., Nakamura T., Ohyama Y., Aizawa H., Suga T., Matsumura Y., Masuda H., Kurabayashi M., Kuro-o M., Nabeshima Y., Nagai R. Klotho protein protects against endothelial dysfunction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1998; 248 (2): 324–329. doi: 10.1006/bbrc.1998.8943
28. Saito Y., Nakamura T., Ohyama Y., Suzuki T., Iida A., Shiraki-Iida T., Kuro-o M., Nabeshima Y., Kurabayashi M., Nagai R. In vivo Klotho gene delivery protects against endothelial dysfunction in multiple risk factor syndrome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2000; 276 (2): 767–772. doi: 10.1006/bbrc.2000.3470
29. Fukino K., Suzuki T., Saito Y., Shindo T., Amaki T., Kurabayashi M., Nagai R. Regulation of angiogenesis by the aging suppressor gene Klotho. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2002; 293 (1): 332–337. doi: 10.1016/S0006-291X(02)00216-4
30. Yuhanna I.S., Zhu Y., Cox B.E., Hahner L.D., Osborne-Lawrence S., Lu P., Marcel Y.L., Anderson R.G., Mendelsohn M.E., Hobbs H.H., Shaul P.W. High-density lipoprotein binding to scavenger receptor-BI activates endothelial nitric oxide synthase. *Nat. Med.*, 2001; 7 (7): 853–857. doi: 10.1038/89986
31. Kuvin J.T., Rämets M.E., Patel A.R., Pandian N.G., Mendelsohn M.E., Karas R.H. A novel mechanism for the beneficial vascular effects of high-density lipoprotein cholesterol: enhanced vasorelaxation and increased endothelial nitric oxide synthase expression. *Am. Heart J.*, 2002; 144 (1): 165–172. doi: 10.1067/mhj.2002.123145

ANALYSIS OF ASSOCIATION OF rs9536314 OF THE KL GENE WITH ANTHROPOMETRIC AND BIOCHEMICAL INDICATORS IN MEN OF NOVOSIBIRSK (WEST SIBERIA)

O.V. Timoshchenko, S.E. Semaev, D.E. Ivanoshchuk, E.M. Stakhneva, Yu.P. Nikitin,
E.V. Shakhtshneider, Yu.I. Ragino

*Research Institute of Internal and Preventive Medicine –
Branch of Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics of SB RAS
630089, Novosibirsk, Boris Bogatkov, 175/1*

Purpose of the study. To determine the frequency of the rs9536314 (F325V) polymorphism of the *KL* gene and the association of this variant with a number of biochemical and anthropometric parameters in men of the study group and in the Caucasian population of Western Siberia. **Materials**

and methods. The study group (69 men, average age 61.2 ± 11.5 years) was randomly formed from a sample of persons who applied to the clinic and polyclinic of NIITPM - a branch of the ICG SB RAS and GBUZ NSO Hospital of war veterans No. 3 (178 men, aged 50-65 years old and over 80 years old). The population group was randomly selected (219 people) from the sample surveyed within the framework of the International Multicenter Project "Risk Factors for Cardiovascular Diseases in Eastern Europe" HAPIEE (9360 participants, 45-69 years old, mean age 53.8 ± 7 years old, Caucasians > 90 %). Biochemical parameters were determined by standard enzymatic methods. Serum concentration of Klotho protein was measured by ELISA. Genomic DNA was amplified by polymerase chain reaction in a standard reaction mixture and further digested with TaqI B restriction enzyme. **Results.** The frequency of genotypes (TT, TG, and GG) and alleles (T and G) rs9536314 of the *KL* gene in the study group corresponds to the data in the population of Western Siberia, as well as the population of Western and Eastern Europe. There were no statistically significant differences in the mean values of the studied clinical and biochemical parameters depending on the rs9536314 genotypes of the *KL* gene in the study group and in the population. In the study group, the level of Klotho protein in the blood and the glomerular filtration rate in men with coronary heart disease and arterial hypertension did not differ in the autosomal dominant and autosomal recessive models for the rs9536314 *KL* gene. **Conclusion.** Thus, the frequency of the rs9536314 polymorphism of the *KL* gene in the study group corresponds to the frequency of the rs9536314 polymorphism of the *KL* gene in the Caucasian population of Western Siberia. Biochemical and anthropometric parameters, as well as the Klotho protein, do not have statistically significant differences depending on the genotypes of rs9536314 of the *KL* gene in the examined men.

Keywords: Klotho gene, rs9536314, ischemic heart disease, population of Western Siberia

*Статья поступила 18 декабря 2020 г.
Принята к печати 29 декабря 2020 г.*