

К генетическому исследованию феномена долгожительства на примере анализа абхазской популяции; полиморфизм *APOE**

Спицын В.А.¹, Макаров С.В.¹, Квеквескири К.Б.², Самохин А.С.¹,
Бец Л.В.³, Бычкова Л.С.¹, Спицына Н.Х.⁴

¹ — Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр», 115478, Москва, ул. Москворечье, 1; e-mail: ecolab@med-gen.ru

² — Абхазский государственный университет, г.Сухум

³ — Московский государственный университет, биологический факультет, кафедра антропологии, Москва

⁴ — Федеральное государственное бюджетное учреждение «Институт этнологии и антропологии», РАН, Москва

Представлены результаты анализа образцов ДНК из буккального эпителия от жителей различных регионов Абхазии. Собранный в 2013 г. материал по программе генетического исследования феномена долгожительства был сгруппирован в две выборки: лица старшей возрастной группы (от 75 лет до 101 года) и контрольная выборка средней по возрасту когорты (от 16 до 33 лет). Был исследован полиморфизм гена аполипопротеина Е (*APOE*) (OMIM +107241), ассоциирующийся с эффектом продолжительности жизни в других популяциях ойкумены. Среди многих заболеваний, связанных с определёнными генотипами *APOE*, носители аллеля *APOE**4 характеризуются повышенным риском развития сердечно-сосудистой патологии. Для абхазских долгожителей установлены частоты аллелей *APOE**3 и *APOE**4 как 0,9359 и 0,0128 соответственно, а в контроле — 0,8315 и 0,0815 соответственно. Различия между сопоставляемыми когортами исследуемых как по частотам генотипов, так и по концентрациям аллелей оказались достоверными (при $\chi^2 > 10$ и 8 соответственно и $p < 0,05$). Доли аллеля *APOE**2 оказываются статистически подобными для обеих выборок. Результаты подтверждают ранее наблюдавшийся факт ещё большего возрастания частоты среди долгожителей наиболее распространённого (в популяции) аллеля и снижения долей самых редких аллелей. Показано, что генотип *APOE* 4-4 и, соответственно, аллель *APOE**4 представляются неблагоприятными для достижения индивидами возраста долгожительства. Напротив, для увеличения продолжительности жизни благоприятными представляются аллель *APOE**3 и генотипы, определяемые этим аллелем.

Ключевые слова: эффекты долгожительства, абхазская популяция, полиморфизм *APOE*

Введение

Известный феномен активного долголетия в Абхазии и ряде других регионов Кавказа вновь привлекает внимание медиков и биологов в связи с обнаружением полиморфных генов, ответственных за продолжительность жизни. Эффект продолжительности жизни может определяться двумя основными группами факторов — эндогенными, связанными с особенностями того или иного организма, и экзогенными, или эколого-средовыми. В центре внимания большинства геронтологических исследований чаще всего оказывались именно эндогенные факторы, определяющие индивидуальные особенности функционирования сердечно-сосудистой, нервной, эндокринной и других систем, имеющих генетическую природу.

Этнический аспект генетических факторов долгожительства может быть обусловлен традициями этнической эндогамии — преимущественным заключением браков внутри этносов, в связи с чем и гены (аллели), способствующие долголетию, могут концентрироваться внутри тех или иных этносов [1]. При этом основной особенностью

брачного института абхазов является характерное для них соблюдение строгой экзогамии по отцовскому и материнскому роду. Экзогамные ограничения распространяются не только на родственников, но и на однофамильцев, приёмных детей и т.д. Выработанный необычайно широкий реестр брачных ограничений со строгим соблюдением всех принципов является следствием наблюдавшегося крайне негативного отношения к возможности кровного родства в браках. Соблюдение в поколениях традиций «структурированной экзогамии» в рамках абхазского этноса приводит к этнической эндогамии и соответственно росту вклада отдалённого кровного родства [4].

A priori можно предполагать, что фактор наследственности играет ведущую роль в формировании явлений группового долгожительства. Тем не менее, совокупность современных генетических исследований позволяет констатировать, что особого «гена долгожительства», очевидно, не существует. Речь может идти о наличии у определённой категории людей своего рода генетических факторов жизнестойкости, которые программируют

* Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований по проекту №14-06-00422а и Российского гуманитарного научного фонда по проекту №12-01-00063а.

успешное функционирование тех или иных физиологических систем. Удачная комбинация генов и совокупности эколого-средовых факторов может способствовать у конкретных индивидов достижению долголетия.

Ярко выраженные случаи активного долголетия в Абхазии и ряде других районов Кавказа привлекали внимание многих отечественных и зарубежных исследователей, например [1, 5, 6]. Одной из существенных задач комплексного изучения популяций с повышенной долей долгожителей является оценка генетической структуры их генофонда. Среди факторов, которые потенциально могли бы играть важную роль в механизме долголетия, значительное место первоначально отводилось анализу генетически обусловленных факторов эритроцитарных антигенов групп крови AB0, Rh, (C,D, E, c, e), MNSs (M,N,S), Kell (K-k), Duffy (Fy^a, Fy^b), Kidd (Jk^a, Jk^b), Lewis (Le^a, Le^b), P, а также сывороточных белков HP, TF, GC, CP, AL и эритроцитарных ферментов AK, ADA, ACP1, PGM1, GPT, GLO1, 6-PGD, PGP. В данном случае вся абхазская популяция условно была подразделена на три группы: I группа включала в себя лиц в возрасте 24—59 лет, II — в возрасте 60—80 лет и III — была представлена только долгожителями (в возрасте 90 лет и старше). В табл. 1 в модифицированной нами и фрагментарной форме представлены результаты обследования абхазской популяции авторов коллективной монографии «Абхазское долгожительство, 1987» [1].

Из рассмотрения распределения фенотипических и аллельных частот 17 независимых локусов (на уровне генной экспрессии) в абхазской популяции становится очевидным, что частоты семи генетических систем (41%) отличаются возрастзависимым распределением. В данном случае преимущественно маркёры генов эритроцитарных ферментов и сывороточных белков характеризуются ещё большим возрастанием частот среди долгожителей наиболее распространённых в популяции аллелей (или в равной мере снижением пропорций самых редких аллеломорфов среди старожиллов).

Важнейшим итогом выполнения проекта Международного проекта «Геном человека» явилась идентификация практически всех генов человека, целый ряд из которых, как показали дальнейшие исследования, прямо или косвенно вовлечён в процесс старения [3]. Особенно перспективной представляется область воздействия на качество здоровья и продолжительность жизни через гены предрасположенности, мутации (или аллельные варианты) которых способствуют развитию тяжёлых мультифакториальных заболеваний.

К числу таких генов принадлежит ген *APOE* (OMIM +107741), расположенный на хромосоме 19 в локусе q13.2, состоящим из 4 экзонов и 3 интронов, кодирующий белок аполипопротеин E (apoE). Методом изоэлектрофокусирования выявляются три общие для человека изоформы apoE: apoE2, apoE3 и apoE4, отличающиеся аминокислотными остатками в положениях 112 (Cys112Arg) и 158 (Arg158Cys), вызванные однонуклеотидными заменами [9]. Аллель E3, определяющий apoE3, является обычным, наиболее распространённым, тогда как аллели E2 (кодирует apoE2) и E4 (кодирует apoE4) являются более редкими формами. Этот полиморфизм в популяциях человека характеризуется 6 генотипами: три гомозиготы (E3/3, E2/2, E4/4) и три гетерозиготы (E2/3, E2/4, E3/4) (цит. по [11]). Полиморфизм E2/E3/E4 оказывает существенное влияние на метаболизм липопротеинов. Установленным фактом является то, что уровень холестерина последовательно повышается от E2 к E3 и E4 (цит. по [2]). Таким образом, изоформы apoE оказывают влияние на концентрации липидов и липопротеинов в сыворотке крови, которые являются важными факторами риска сердечно-сосудистых заболеваний. В работе [7] показано, что частота аллеля e4 среди пациентов с болезнью Альцгеймера (БА) связана с возрастом начала развития заболевания. У пациентов с началом БА до 60 лет и после 80 лет частота e4 ниже, чем в возрастном промежутке 65–75 лет. Риск возникновения БА у гомозигот по e4 возрастает с 5- до 15-кратного уровня от 40 до 60 лет, а затем снижается к 90 годам. В 1994 г. [10] была обнаружена повышенная частота аллеля APOE

Таблица 1

Распределение частот аллелей и гаплотипов генетико-биохимических и серологических маркёров в различных возрастных группах из абхазской популяции (по данным из монографии «Абхазское долгожительство, 1987»)

Система и аллель (гаплотип)	24 — 59 лет		60 — 89 лет		90 лет и старше	
	N	Частота аллеля	N	Частота аллеля	N	Частота аллеля
GC*1	145	0,7827*	130	0,7231*	71	0,9838*
ESD*1	124	0,8064*	91	0,7912*	26	0,9838*
ACP*B	132	0,6439	99	0,6465	27	0,7592
AK*1	131	0,9618	99	0,9445	27	0,9815
GLO1*2	133	0,6091*	108	0,5555*	27	0,7592*
MNSs(Ns)	249	0,2698*	185	0,2273*	82	0,3751*
RH (CDe)	244	0,4274*	180	0,4164*	82	0,3027*
Примечание. * — статистически значимые различия между когортой старожиллов и двумя сравниваемыми группами меньшего возрастного интервала						

е2 среди людей, доживших до столетнего возраста. Частота фактора е2 среди людей старше 90 лет оказалась вдвое больше, чем среди людей среднего возраста (44—53 лет). Таким образом, система АРОЕ е2 может быть ассоциирована с эффектом долгожительства. Влияние генетической изменчивости на продолжительность жизни является весьма важным вопросом, нуждающихся в эффективных исследованиях. Межпопуляционные исследования показывают, что частота встречаемости аллеля е4 может оказывать влияние на географические вариации риска ИБС наряду с экологическими особенностями и образом жизни населения разных географических зон.

Материалы и методы

В исследование были включены образцы буккально-го эпителия, полученные при обследовании жителей Абхазии коренной национальности. Сбор биоматериала одобрен Этическим комитетом Абхазского государственного университета осуществлялся с получением информированного согласия от каждого обследуемого на

участие в исследовании и заполнением бланков популяционно-генетического анкетирования о месте рождения. Были сформированы две выборки:

1) лица старшей возрастной группы (от 75 лет до 101 года);

2) контрольная выборка средней по возрасту когорты (от 16 до 33 лет). В целом, было коллекционировано и изучено 170 образцов биологического материала.

Генотипирование АРОЕ. Экстракция ДНК проводилась с использованием набора «ДНК-сорб-В» (ФГУН «ЦНИИЭ» Роспотребнадзора). Полиморфизм в 4-м экзоне гена АРОЕ (Arg158Cys и Cys112Arg) был исследован методом полимеразной цепной реакции с использованием праймеров: 5'-CGGCTGGGCGCGGACATGGAGGA-3' и 5'-TCGCGGGCCCCGGCCTGGTACAC-3' [8]. Продукты ПЦР после обработки рестриктазой *HhaI* фракционировали методом электрофореза в 7,5%-ном полиакриламидном геле с последующей окраской бромистым этидием. Визуализация электрофоретических зон характеризующих аллели АРОЕ*2, АРОЕ*3 и АРОЕ*4 осуществлялась в ультрафиолетовом свете.

Таблица 2

Численности генотипов и частоты аллелей системы АРОЕ в изученной выборке из абхазской популяции, в целом

Генотипы	Наблюдаемые	Ожидаемые	Частоты аллелей
3-3	133	131,47	АРОЕ*3 = 0,8794 ± 0,0177
2-3	21	21,11	АРОЕ*2 = 0,0706 ± 0,0139
3-4	12	14,95	АРОЕ*4 = 0,0500 ± 0,0118
2-4	1	1,20	$\chi^2 = 6,4981$ d.f. = 3 P > 0,05
4-4	2	0,43	
2-2	1	1,20	

Таблица 3

Численности генотипов АРОЕ в сравниваемых группах абхазов преклонного возраста и контрольной выборки

Долгожители (N = 78)			Контроль (N = 92)		
Генотипы	N (obs.)	N (exp.)	Генотипы	N (obs.)	N (exp.)
3-3	69	67,32	3-3	64	63,61
2-3	7	7,49	2-3	14	13,30
3-4	1	1,87	3-4	11	12,47
2-4	1	1,10	2-4	0	0,70
4-4	0	0,01	4-4	2	0,61
2-2	0	0,21	2-2	1	1,30

Таблица 4

Распределение частот аллелей гена АРОЕ среди лиц преклонного возраста и в контроле из абхазской популяции

Частоты аллелей	Долгожители	Контроль
АРО*Е3	0,9359 ± 0,0196**	0,8315 ± 0,0276**
АРО*Е2	0,0513 ± 0,0177	0,0870 ± 0,0208
АРО*Е4	0,0128 ± 0,0090**	0,0815 ± 0,0202**
χ^2 (на равновесие Харди—Вайнберга)	$\chi^2 = 8,5150$; d.f. = 3 P < 0,05	$\chi^2 = 4,8038$; d.f. = 3 P > 0,05

Статистическая обработка полученных результатов осуществлялась с использованием пакета программ Statistica 6.0 (StatSoft Inc.). Достоверность различий в частотах генотипов и аллелей *APOE* между сравниваемыми группами определяли по величине критерия χ^2 .

Результаты и обсуждение

Наличие полиморфизма в гене *APOE* в суммарной выборке изученных абхазов позволило выявить следующие генотипы: 3/3, 2/3, 3/4, 4/4, 2/4 и 2/2 (табл. 2).

Наблюдаемое соотношение генотипов удовлетворительно соответствует теоретически ожидаемому при величине $\chi^2 = 6,4981$. Концентрация генотипов *APOE* в изученной популяции сходно с распределением таковых в европеоидных группах.

В табл. 3 представлены сравнительные данные по численностям генотипов *APOE* для двух возрастных групп абхазов, условно обозначенных как «долгожители» и «контроль». Результаты позволяют констатировать, что среди лиц преклонного возраста отсутствуют редкие гомозиготные формы *APOE* 2-2 и 4-4, а также только в одном случае наблюдалась гетерозигота 3-4 по редкому аллелю *APOE**4.

Таблица 4 демонстрирует данные о распределении частот аллелей гена *APOE* среди лиц старшей возрастной группы и в средней по возрасту когорте (в качестве контроля). Статистически значимые различия были констатированы между долгожителями и контролем по частотам аллелей *APOE**3 и *APOE**4 на уровне $P < 0,05$. Таким образом, наши результаты подтверждают тенденцию к максимальному возрастанию среди долгожителей частоты наиболее распространенных в популяциях аллелей (или в равной мере снижением пропорций среди них самых редких аллелей).

Группа долгожителей также достоверно отличается от контрольной выборки по частотам генотипов при $\chi^2 = 10,072$; d.f. = 5; $P < 0,05$. Генотипы 3-4 и 4-4, а также аллель *APOE**4 представляются неблагоприятными для достижения индивидами возраста долгожительства. Напротив, для потенциального возрастания продолжительности жизни благоприятным представляется аллель *APOE**3 и генотипы, определяемые данным аллелем.

Список литературы

1. Абхазское долгожительство / Отв. ред. В.И. Козлов. — М.: Наука, 1987. — 294 с.
2. Виноградова С.В. Роль полиморфизма E2/ E3/E4 гена аполипопротеина E в развитии атеросклероза // Медицинская генетика. — 2006. — Т. 4, №2 (44). — С. 3—10.
3. Генетический паспорт — основа индивидуальной и предиктивной медицины / под ред. В.С.Баранова. — СПб.: Н-Л, 2009. — 527 с.
4. Спицына Н.Х. Демографический переход в России. — М.: Наука, 2006. — 213 с.
5. Benet S. Abkhazians: the long-living people of the Caucasus. — N.Y. Holt: Rinehard and Winston, 1974. — 112 p.
6. Benet S. How to live to be 100. The life style of the peoples of the Caucasus. — N.Y.: The Dial Press, 1976. — 86 p.
7. Frisoni G., Manfredy M., Geroldi C. et al. The prevalence of apoE-e4 in Alzheimer's disease is age dependent // Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry. — 1998. — Vol. 65. — P. 103—106.
8. Hixson J.E., Vernier D.T. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI // J. Lipid Res. — 1990. — Vol. 31. — P. 545—548.
9. Riddell D.R., Graham A., Owen J.S. Apolipoprotein E inhibits platelet aggregation through the L-arginine nitric oxide pathway. Implications for vascular disease // J. Biol. Chem. — 1997. — Vol. 272. — P. 89—95.
10. Schachter F., Faure-Delanef L., Guenet F. et al. Genetic associations with human longevity at the *APOE* and *ACE* loci // Nat. Genet. — 1994. — Vol. 6 — P. 29—32.
11. Siest G., Pillot T., Regis-Bailly A. et al. Apolipoprotein E: An important gene and protein to follow in laboratory medicine // Clinical Chemistry. — 1995. — Vol. 41, №8. — P. 1068—1086.

To the genetic study of the long-living phenomenon on the example Abkhasian population analysis; *APOE* polymorphism

Spitsyn V.A.¹, Makarov S.V.¹, Kvekveskiri K.B.², Samokhin A.S.¹, Betz L.V.³, Bichkovskaya L.S.¹, Spitsyna N.Kh.⁴

¹ — Federal State Budgetary Institution «Research Centre for medical Genetics» of Russian Academy of Medical Sciences, 115478, Moscow, Moskvorechie str., 1; e-mail: ecolab@med-gen.ru

² — Abkhazian State University; Sukhum

³ — Moscow State University, Biological Faculty, Department of Anthropology

⁴ — Federal State Budgetary institution «Institute of Ethnology and Anthropology» Russian Academy of Sciences, Moscow

Analysis of DNA samples from buccal epithelium of Abkhazian residents was submitted for *APOE* polymorphism. The material was collected in 2013 and it was grouped according to the genetic research into two samples: a) persons of oldest age group (from 75 to 101 year); b) a control group of an average age cohort persons (from 16 to 33 years). *APOE* polymorphism (OMIM +107241) associated with effect of life duration in other world populations were investigated. Among many diseases which are associated with certain *APOE* genotypes, carriers of *APOE**4 allele are characterized by the increased risk of development of cardiovascular pathology. *APOE**3 and *APOE**4 allele frequencies demonstrated for Abkhazian long-livers were 0,9359 and 0,0128 respectively, while in control group these frequencies were 0,8315 and 0,0815 respectively. Distinctions between the compared cohorts concerning alleles *APOE**3 and *APOE**4 frequencies were significant (at $\chi^2 > 10$ and 8 respectively and $P < 0,05$). Distinctions between the compared groups concerning genotype frequencies were also significant ($\chi^2 = 10,072$; d.f. = 5; $P < 0,05$). Frequencies of *APOE**2 allele were statistically similar for both samples. So the *APOE* 4-4 genotype and *APOE**4 allele seem to be unfavorable for the oldest age group. On the contrary, *APOE**3 allelomorph and genotypes connected with *APOE**3 are favorable factors. Our results confirmed previous observation that frequency of the «wild» genetic factors increases to the maximum in the oldest age group.

Key words: effects of longevity, Abkhazian population, *APOE* polymorphism