

УДК 575.174.015.3:615.273.53:572.79 (1-925.14)

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА *VKORC1* (*C1173T*), ОПРЕДЕЛЯЮЩЕГО ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ИНДИВИДОВ К ВАРФАРИНУ, В ПОПУЛЯЦИЯХ КОРЕННЫХ ЭТНОСОВ СЕЛЬКУПОВ И ТУНДРОВЫХ НЕНЦЕВ, А ТАКЖЕ У РУССКИХ СЕВЕРНОЙ СИБИРИ***Р. П. Корчагина, Л. П. Осипова, Н. А. Вавилова, Е. Н. Воронина, М. Л. Филипенко*****THE POLYMORPHISM OF THE *VKORC1* (*C1173T*) GENE, DETERMINING INDIVIDUAL SUSCEPTIBILITY TO WARFARIN, IN POPULATIONS OF INDIGENOUS PEOPLES OF SELKUPS AND TUNDRA NENETS AND IN THE RUSSIANS OF NORTHERN SIBERIA*****R. P. Korchagina, L. P. Osipova, N. A. Vavilov, E. N. Voronina, M. L. Filipenko***

Проведено исследование полиморфизма *VKORC1 C1173T* в популяциях коренных самодийских этносов, селькупов и тундровых ненцев, а также у русских Северной Сибири в связи с определением популяционной чувствительности к антикоагулянту варфарину. Показано, что в изученных самодийских популяциях, по сравнению с русскими Северной Сибири, существенно преобладает мутантный гомозиготный генотип *VKORC1 1173TT*, частота которого составляет 57,1 % у тундровых ненцев, 71,8 % у селькупов и 13,6 % у русских. Частоты аллеля *VKORC1 1173T* у самодийцев (74,7 % у тундровых ненцев; 84,6 % у селькупов) значительно и достоверно превышают таковые для русских Северной Сибири (36,9 %). Результаты проведенного исследования могут быть использованы в протоколах дозирования варфарина в целях достижения максимально безопасной и эффективной терапии.

In relation with determining population sensitivity to warfarin the study of the *VKORC1 C1173T* polymorphism in Northern Siberia populations of indigenous Samoedic peoples (Selkups and Tundra Nenets) and also in Russians has been conducted. It was revealed, the mutational genotype *VKORC1 1173TT* considerably dominations in studied Samoedic populations as compared with Russians. The frequencies of genotype *VKORC1 1173TT* were 57,1 % in Tundra Nenets, 71,8 % in Selkups and in 13,6 % Russians. The frequencies of *VKORC1 C1173T* allele in Tundra Nenets (74,7 %) and Selkups (84,6 %) essentially and reliably are above ones in Russians of Northern Siberia (36,9 %). Our data can be used in the protocols of recommendations for dosing warfarin with a view to reaching at most safe and efficient therapy in populations of native residents of Northern Siberia.

Ключевые слова: *VKORC1 C1173T*, антикоагулянт варфарин, коренные этносы Северной Сибири, real-time PCR.

Keywords: *VKORC1 C1173T*, anticoagulant warfarin, indigenous peoples of Northern Siberia, real-time PCR.

Введение

Ген *VKORC1*, локализованный на хромосоме 16 в области p12-q21, кодирует субъединицу 1 витамина К эпоксидредуктазного комплекса (*VKOR*). Белок *VKORC1* состоит из 163 аминокислотных остатков общим размером 18 кДа [10, с. 127 – 140; 15, с. 347 – 353]. *VKORC1* – это ключевой фермент в цикле витамина К, осуществляющий превращение неактивной формы витамин К 2,3-эпоксида в активную восстановленную форму витамин К-гидрохинон. Витамин К-гидрохинон является кофактором для фермента γ -глутамилкарбоксилазы, которая катализирует реакцию посттрансляционного карбоксилирования остатков глутаминовой кислоты в витамин К-зависимых белков (факторы свертывающей и противосвертывающей систем крови, белки костного метаболизма), тем самым активируя данные факторы [8, с. 1 – 7; 10, с. 127 – 140].

Фермент *VKORC1* является «мишенью» для не-прямых антикоагулянтов кумаринового ряда, к которому относится варфарин, широко применяющийся в лечении и профилактике тромбозов, инфарктов и других сердечно-сосудистых осложнений [3, с. 177 – 179; 16, с. 1 – 6; 22, с. 1013 – 1021]. Однако во время терапии варфарином у пациентов могут развиваться нежелательные побочные реакции в виде кровотечений. Наиболее опасными из них являются желудочно-кишечные кровотечения и кровоизлияние в мозг [6, с. 72 – 77]. Для повышения безопасно-

сти применения антикоагулянта необходимо учитывать все предрасполагающие факторы к развитию кровотечений (вес, пол, возраст пациента, наличие сопутствующих заболеваний др.), в том числе и генетическую предрасположенность, обусловленную этнической принадлежностью индивида [5, с. 77 – 79; 13, с. 1609 – 1616; 14, с. 3827 – 3834].

Риск возникновения кровотечений у индивидов связан с полиморфизмом в нескольких генах [4, 7]. Одним из таких полиморфизмов является *VKORC1 C1173T* в гене *VKORC1*, обусловленный заменой остатка цитозина на остаток тимина в позиции 1173 первого интрона гена (rs9934438). Этот полиморфный вариант, приводящий к снижению активности фермента, ассоциирован с повышенной чувствительностью индивидов к варфарину [21, с. 262 – 270]. Индивидам с мутантным аллелем *VKORC1 1173T* требуются более низкие дозы варфарина, по сравнению с носителями нормального аллеля *VKORC1 1173C*, причем средняя ежедневная доза снижается на 43 % для гомозигот *VKORC1 1173TT* и на 22 % для гетерозигот *VKORC1 1173CT* [9, с. 645 – 649]. По данным разных исследователей, аллель *VKORC1 1173T* встречается примерно у 9 % африканцев, 36 – 45 % европейцев и 84 – 92 % азиатов [12, с. 611 – 613; 17, с. 1723 – 1729; 22, с. 1013 – 1021].

Основанием для проведения настоящего исследования является отсутствие сведений о распро-

странности полиморфизма *VKORC1 C1173T*, определяющего чувствительность индивидов к варфарину, в популяциях коренных малочисленных этносов и у русских Северной Сибири, в связи с повсеместно увеличивающейся в настоящее время частотой сердечно-сосудистых заболеваний. Цель исследования – изучить распределение полиморфизма *VKORC1 C1173T* в популяциях коренных самодийских этносов селькупов и тундровых ненцев, а также у русских Северной Сибири.

Материалы и методы

В исследовании приняли участие этнические представители селькупов и тундровых ненцев, проживающих в Ямало-Ненецком автономном округе (ЯНАО) РФ, а также русских, проживающих в ЯНАО и Красноярском крае (территория Северной Сибири). Тундровых ненцев и селькупов относят к самодийской ветви уральской языковой семьи. По антропологическим и генетическим данным, в их генофондах фиксируются европеоидная и монголоидная компоненты [1, с. 103 – 145; 2, с. 129 – 140]. Селькупский этнос в настоящее время представлен южными селькупками, расселенными в основном на территории Томской области, и северными селькупками, живущими на территориях Туруханского района Красноярского края и ЯНАО. Согласно переписи 2002 г, на территории ЯНАО проживают 1797 селькупов [http://www.perepis2002.ru/ct/html/ТОМ_13_01.htm]. Ненцы – самый крупный из самодийских этносов, который включает в себя европейских и сибирских тундровых и лесных ненцев. Тундровые ненцы составляют основу коренного населения ЯНАО и Ненецкого автономного округа. Согласно переписи 2002 г, на территории ЯНАО проживают

26435 ненцев [http://www.perepis2002.ru/ct/html/ТОМ_13_01.htm].

Генетический материал для исследования собиранся во время экспедиций в Ямало-Ненецкий автономный округ и Красноярский край сотрудниками лаборатории популяционной этногенетики ИЦиГ СО РАН в период 1988 – 2009 гг. под руководством канд. биол. наук Л. П. Осиповой. Забор крови производился квалифицированным медицинским персоналом по международным правилам с использованием «Информированного согласия» от добровольцев, практически здоровых на момент исследования. Выборки, в которые не вошли метисы разных уровней от браков с русским и другими пришлыми этносами, были сформированы из пула этнических представителей селькупов (N = 330) и тундровых ненцев (N = 310). В исследование были также включены 346 представителей этнических русских Северной Сибири.

Образцы ДНК были выделены из лейкоцитарных фракций венозной крови стандартным фенол-хлороформным методом с использованием протеиназы К. Генотипирование однонуклеотидных замен в гене *VKORC1* проводилось в режиме реального времени с использованием конкурирующих TaqMan-зондов, комплементарных полиморфным участкам ДНК. Структуры праймеров и зондов приведены в таблице 1. Общий объем реакционной смеси составлял 25 мкл, смесь содержала ДНК с концентрацией 15 нг/мкл, 300 нМ каждого праймера; по 100 – 200 нМ Taqman-зондов, конъюгированных с FAM или R6G; 200 мкМ dNTPs, амплификационный буфер (650 мМ Tris-HCl, 240 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,5 % Tween 20, 35 мМ MgCl₂), термостабильную Taq-полимеразу – 0,5 ед. акт./реакц.

Таблица 1

Структуры праймеров и зондов для локуса *VKORC1*

Последовательность праймеров	Последовательность зондов
5'- GGGAGGATAGGGTCAGTG -3'	5'R6G-CTAGTCCAAGGGTCGATGATC-BHQ2-3'
5'- ACCTGGGCTATCCTCTGTTC -3'	5'-FAM-CCTAGTCCAAGAGTCGATGATC-BHQ2-3'

ПЦР проводилась в следующих условиях: начальная денатурация 1 мин 30 сек при 96 °С; затем 45 циклов, включающих денатурацию при 96 °С 8 сек, отжиг праймеров и последующую элонгацию при 60 °С в течение 40 сек (каждый шаг сопровождался регистрацией флуоресцентного сигнала в диапазонах, соответствующих интервалам флуоресценции флуорофоров FAM и R6G. Работа проводилась с использованием амплификатора iCycler iQ 4 (Bio-Rad, USA). Полученные данные обрабатывались с помощью программы «Bio-Rad iQ5». Популяционные частоты аллельных вариантов вычисляли на основе наблюдаемых частот генотипов. Оценку соответствия частот генотипов равновесию Харди-Вайнберга проводили с использованием критерия χ^2

(Пирсона), применяя on-line тест-программу [http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl] (при $p > 0,05$ равновесие выполняется). Оценку достоверности различий по частотам аллелей между исследованными выборками проводили по критерию χ^2 с помощью статистической программы Statistica 1993 (при $p < 0,05$ результаты считались достоверно значимыми).

Результаты и обсуждение

Распределение частот генотипов *VKORC1* представлено в таблице 2. Во всех выборках наблюдается соответствие распределения частот генотипов равновесию Харди-Вайнберга.

Таблица 2

**Частоты *VKORC1* – генотипов и их соответствие равновесию Харди-Вайнберга
в исследованных популяциях**

Популяция	Размер выборки	Генотипы <i>VKORC1</i>			Соответствие частот генотипов равновесию Харди-Вайнберга
		СС	СТ	ТТ	
Селькупы	330	2,7 % (9)	25,5 % (84)	71,8 % (237)	p = 0,638
Тундровые ненцы	310	7,7 % (24)	35,2 % (109)	57,1 % (177)	p = 0,216
Русские Северной Сибири	346	39,9 % (138)	46,5 % (161)	13,6 % (47)	p = 0,997

Примечание: в скобках приведено количество лиц с определенным генотипом.

Выявлено, что в исследованных самодийских популяциях преобладает мутантный гомозиготный генотип *VKORC1 1173TT*, частота которого составила 57,1 % у тундровых ненцев и 71,8 % у селькупов. Высокие частоты мутантного генотипа, около 84 – 92 %, характерны также для монголоидных популяций [12, 20]. Однако в нашей выборке русских Северной Сибири, у русских, проживающих в Санкт-Петербурге, и в других европеоидных популяциях

доля гомозиготного мутантного генотипа *VKORC1 1173TT* существенно снижена и варьирует в пределах 14 – 19 % [11, с. 2020 – 2024; 12, с. 611 – 613; 17, с. 1723 – 1729; 19, с. 487; 22, с. 1013 – 1021].

Нами проведен парный сравнительный анализ частот мутантного аллеля *VKORC1 1173T* между исследованными и некоторыми другими популяционными выборками (таблица 3).

Таблица 3

Частоты *VKORC1 1173T* аллеля и достоверность различий между популяциями

Популяция	Общее число аллелей	Частота аллеля <i>VKORC1 1173T</i> , %	Селькупы	Тундровые ненцы	Русские Северной Сибири
Селькупы	660	84,6		$\chi^2=2,1$; p=0,15	$\chi^2=80,2$; p=0,00
Тундровые ненцы	620	74,7	$\chi^2=2,1$; p=0,15		$\chi^2=54,7$; p=0,00
Русские Северной Сибири	692	36,9	$\chi^2=80,2$; p=0,00	$\chi^2=35,1$; p=0,00	
Европеоиды (Франция) [16]	878	40,0	$\chi^2=77,3$; p=0,00	$\chi^2=50,2$; p=0,00	$\chi^2=0,6$; p=0,43
Монголоиды (Китай, Han Chinese) [11]	780	92,0	$\chi^2=1,1$; p=0,29	$\chi^2=6,5$; p=0,01	$\chi^2=105,9$; p=0,00

Примечание: жирным шрифтом выделены достоверно различающиеся величины в парном сравнении.

Сравнительный анализ показал, что частота мутантного аллеля *VKORC1 1173T* выше у селькупов (84,6 %), чем у тундровых ненцев (74,7 %), но эти различия не являются достоверными (p = 0,15). Тем не менее частоты *VKORC1 1173T* в выборках тундровых ненцев и селькупов существенно и достоверно превышают таковые в выборках русских Северной Сибири и европеоидов Франции (p = 0,00), но являются более низкими по сравнению с частотами, наблюдаемыми в китайской выборке. Такое распределение *VKORC1 1173T* в популяциях показывает, что самодийцы занимают промежуточное положение между европеоидами и монголоидами по частотам встречаемости данного аллеля. Этот факт согласуется с антропологическими и генетическими данными о наличии в генофондах этих коренных этносов как европеоидной, так и монголоидной компонент.

Многими исследователями показано наличие ассоциации полиморфизма *VKORC1 C1173T* с повышенной чувствительностью пациентов-носителей этого варианта к варфарину и риску развития кровотечений [9, с. 645 – 649; 12, с. 611 – 613; 18, с. 996 – 998; 22, с. 1013 – 1021]. Выявление наличия подобной связи в популяциях коренных этносов Сибири (селькупов и тундровых ненцев) возможно будет провести при включении в исследование представителей указанных этносов, нуждающихся в терапии варфарином. На настоящий момент мы имеем выборки только практически здоровых индивидов. Однако исследование выявило, что мутантный вариант *VKORC1 1173T* широко распространен в исследованных популяциях, а особенно – среди самодийцев, поэтому, предполагая, что такая связь существует и у коренных этносов, – необходимо лечащим врачам в случае назначения терапии антикоагулянтом варфарином с осторожностью подбирать дозу лекарства

для индивидов с аллелем *VKORC1 1173T*. В особо чувствительную группу риска предположительно входят индивиды с гомозиготным генотипом – *VKORC1 1173TT*. Вероятно, для лиц с данным генотипом потребуются более низкие дозы препарата, чем для индивидов с генотипами *VKORC1 1173CT* и *CC*.

Таким образом, в настоящем исследовании впервые изучен полиморфизм гена *VKORC1 (C1173T)* в популяциях селькупов, тундровых ненцев и русских Северной Сибири в этническом контексте. Показаны резкие этнические различия между коренными самодийскими популяциями и русскими Сибири по частоте распространенности мутантного варианта *VKORC1 1173T*. Высказано предположение о существовании связи между наличием варианта *VKORC1 1173T* и чувствительностью к антикоагулянту варфарину у коренных самодийских этносов (селькупов и тундровых ненцев). Результаты проведенного исследования могут учитываться врачами при назначении терапии варфарином в целях достижения максимально безопасного и эффективного лечения на индивидуальном уровне среди исследованных лиц, а также в целях дополнительного изучения механизмов развития, лечения и профилактики сердечно-сосудистых заболеваний и других патологий, в которых задействованы витамин К-зависимые белки.

Финансовая поддержка данного исследования осуществлялась Интеграционным проектом № 5.5 (2006 – 2008 гг.), Гос. контрактом № 01-15/36 и экспедиционными грантами СО РАН № 1/8 за 2008 г. и № 1/2 за 2009 г. (для О.Л.П.); Интеграционными проектами СО РАН № 17 (2009-2011 гг.) и № 84 (2009-2011 гг.) (для Ф.М.Л.).

Авторы выражают глубокую благодарность представителям коренных этносов, принявшим участие в данном исследовании. А также Андреевскому О. В., Бочкареву М. Н., Зубкову Е. А. за выделение образцов ДНК; Бурлаковой Н. А., Чуркиной Т. В., Молотовой Н. А., Карафет Т. М. и Венреву С. Г. за помощь в проведении экспедиционных исследований.

Литература

1. Дебеч, Г. Ф. Селькупы (антропологический очерк) [Текст] / Г. Ф. Дебеч // Труды института этнографии. – М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1947.
2. Осипова, Л. П. Генетические маркеры иммуноглобулинов (система Gm) для оценки процессов миграции и метисации в популяциях человека в Северной Сибири [Текст] / Л. П. Осипова // Сибирский экологический журнал. – 1994. – Т. 1. – № 2.
3. Панченко, Е. П. Венозные тромбозы в терапевтической клинике. Факторы риска и возможности профилактики [Текст] / Е. П. Панченко // Сердце. – 2002. – Т. 1. – № 4. – Вып. 4.
4. Сироткина, О. В. Аллельные варианты *CYP2C9*2* и *CYP2C9*3* гена цитохрома *CYP2C9* в популяции Санкт-Петербурга и их клиническое значение при антикоагулянтной терапии варфарином

[Текст] / О. В. Сироткина, А. С. Улитина, А. Е. Тараскина и др. // Российский кардиологический журнал. – 2004. – № 6.

5. Сычев, Д. А. Генетическая основа чувствительности к непрямых антикоагулянтам: фокус на полиморфизм генов *VKORC1* и *APOE* [Текст] / Д. А. Сычев, И. В. Игнатъев, В. Г. Кукес // Российский кардиологический журнал. – 2005. – Т. 55.

6. Сычев, Д. А. Фармакогенетика непрямых антикоагулянтов: значение генотипа в повышении эффективности и безопасности терапии [Текст] / Д. А. Сычев, Е. С. Кропачева, И. В. Игнатъев и др. // Кардиология. – 2006. – № 7.

7. Caldwell, M. D. *CYP4F2* genetic variant alters required warfarin dose [Text] / M. D. Caldwell, T. Awad, J. A. Johnson // Blood. – 2008. – Vol. 111. – No. 8.

8. Crawford, D. *VKORC1* common variation and bone mineral density in the third national health and nutrition examination survey [Text] / D. Crawford, K. Brown-Gentry, M. Rieder // PLoS ONE. – 2010. – Vol. 5. – No. 12.

9. D'Andrea, G. A polymorphism in the *VKORC1* gene is associated with an interindividual variability in the dose-anticoagulant effect of warfarin [Text] / G. D'Andrea, R. L. D'Ambrosio, P. D. Perna et al. // Blood. – 2005. – Vol. 105. – No. 2.

10. D'Andrea, G. Oral anticoagulations: Pharmacogenetics Relationship between genetic and non-genetic factors [Text] / G. D'Andrea, R. L. D'Ambrosio, M. Margaglione // Blood Reviews. – 2008. – Vol. 22.

11. Lacut, K. Vitamin K epoxide reductase genetic polymorphism is associated with venous thromboembolism: results from the EDITH study [Text] / K. Lacut, C. Larramendy-Goizalo, G. Le Gal et al. // Journal of Thrombosis and Haemostasis. – 2007. – Vol. 5.

12. Larramendy-Goizalo, C. Genetic polymorphism of vitamin K epoxide reductase (*VKORC1*) 1173C>T in a Chinese and a Caucasian population [Text] / C. Larramendy-Goizalo, J. Q. Yang, C. L. Verstuyft et al. // Pharmacology and Toxicology. – 2006. – Vol. 98.

13. Lee, M. *VKORC1* haplotypes in five East-Asian populations and Indians [Text] / M. Lee, C. Chen, H. Chuang // Pharmacogenomics. – 2009. – Vol. 10. – No. 10.

14. Limdi, N. A. Warfarin pharmacogenetics: a single *VKORC1* polymorphism is predictive of dose across 3 racial groups [Text] / N. A. Limdi, M. Wadelius, Cavallari L. et al. // Blood. – 2010. – Vol. 115. – No. 18.

15. Oldenburg, J. Vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 (*VKORC1*): the key protein of the vitamin K cycle [Text] / J. Oldenburg, C. G. Bevens, C. R. Muller, M. Watzka // Antioxid Redox Signal. – 2006. – Vol. 8. – No. 3–4.

16. Oldenburg, J. *VKORC1*: molecular target of coumarins [Text] / J. Oldenburg, M. Watzka, S. Rost, C. R. Muller // Journal of Thrombosis and Haemostasis. – 2007. – Vol. 5. – No. 1.

17. Osman, A. Main haplotypes and mutational analysis of vitamin K epoxide reductase (*VKORC1*) in a

Swedish population: a retrospective analysis of case records [Text] / A. Osman, C. Enstrom, K. Arbring, P. Soderkvist, L. Lindahl // Journal of Thrombosis and Haemostasis. – 2006. – Vol. 4.

18. Reitsma, P. H. *C1173T* dimorphism in the *VKORC1* gene determines coumarin sensitivity and bleeding risk [Text] / P. H. Reitsma, J. F. van der Heijden, A. P. Groot, F. R. Rosendaal, H. R. Buller // PLOS Medicine. – 2005. – Vol. 2. – No. 10.

19. Sirotkina, O. The vitamin K epoxide reductase gene polymorphisms and pharmacogenetics of warfarin [Text] / O. Sirotkina, A. Ulitina, A. Markov, T. Vavilova // Journal of Thrombosis and Haemostasis. – 2007. – Vol. 5. – No. 2.

20. Suh, J. W. Vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 gene polymorphism is associated with

atherothrombotic complication after drug-eluting stent implantation: 2 – Center protective cohort study [Text] / J. W. Suh, S. H. Baek, J. S. Park et al. // Am. Heart. J. – 2009. – Vol. 157. – No. 5.

21. Wadelius, M. Common *VKORC1* and *GGCX* polymorphisms associated with warfarin dose [Text] / M. Wadelius, L. Y. Chen, K. Downes et al. // Pharmacogenomics Journal. – 2005. – Vol. 5.

22. Wang, Y. Regulatory polymorphism in Vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 (*VKORC1*) affects gene expression and warfarin dose requirement / Y. Wang, H. Chen, K. M. Moramy // Blood. – 2008. – Vol. 112. – No. 4.