

УДК 575.17:616.1

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ АЛЛЕЛЕЙ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ Leu33Pro И Leu66Arg ГЕНА *ITGB3* У ЖИТЕЛЕЙ СИБИРСКОГО РЕГИОНА

© 2013 г. И. А. Гончарова^{1, 2}, Н. П. Бабушкина¹, Л. И. Минайчева¹, В. В. Маркова¹,
Е. В. Кулиш¹, Р. Р. Салахов², О. А. Макеева^{1, 2}, В. П. Пузырев¹

¹Научно-исследовательский институт медицинской генетики Сибирского отделения Российской академии
медицинских наук, Томск 634050

e-mail: irina.goncharova@medgenetics.ru

²Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний
Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, Кемерово 650002

e-mail: reception@cardio.kem.ru

Поступила в редакцию 03.10.2012 г.

Изучена частота полиморфного варианта T196C (Leu33Pro, rs5918) гена *ITGB3* у женщин с репродуктивными нарушениями, больных ишемической болезнью сердца с острым коронарным синдромом и в группе популяционного контроля. Частота редкого аллеля *PLA2* у жителей г. Томска соответствовала 14.7%, г. Кемерово – 15.0%. Частота аллеля *PLA2* (22.1%) и генотипа *PLA2/PLA2* (8.8%) у женщин с невынашиванием беременности отличалась от контрольной группы (14.7%, $p = 0.017$; 2.1%, $p = 0.0009$). Секвенирование выявило мутацию rs36080296 (T216G, Leu66Arg), частота которой у женщин с репродуктивными нарушениями достигала 2.7%; в группе с невынашиванием беременности – 4.4%, что значительно отличалось от контроля (0.08%, $p = 0.2 \times 10^{-6}$). Мутация rs36080296 может служить фактором, предрасполагающим к невынашиванию беременности, особенно в сочетании с аллелем *PLA2*.

DOI: 10.7868/S0016675813070059

В настоящее время большое внимание уделяется изучению особенностей функционирования генома человека в норме и при различных патологических состояниях. Наличие структурного генетического полиморфизма не только определяет разнообразие популяций человека, но и является фактором, формирующим предрасположенность к различным патологическим состояниям, чувствительность к лекарственным препаратам, например полиморфный вариант rs5918 (Leu33Pro) гена рецептора тромбоцитов *ITGB3*. Показано, что замена аминокислот лейцина на пролин, приводящая к повышению агрегационных свойств тромбоцитов, ассоциирована с инфарктом миокарда, коронарным атеросклерозом [1, 2], коронарным тромбозом стента, острой коронарной недостаточностью [3], инсультом [4] и влияет на снижение эффективности некоторых антиагрегантов, таких как аспирин и клопидогрел [5]. Кроме этого, показано, что наличие аллельного варианта 33Pro, обозначаемого как *PLA2*, является фактором риска развития акушерской патологии: нарушение имплантации, развитие гестоза, плацентарной недостаточности [6].

Ген *ITGB3* кодирует субъединицу IIIa мембранного белкового комплекса тромбоцитов GPIIb/IIIa. Этот комплекс является членом се-

мейства интегринов и участвует в агрегации тромбоцитов в качестве рецептора для фибриногена, фактора фон Виллебранда и фибронектина. Ген *ITGB3* локализован на 17q21.32 и имеет 14 экзон. К настоящему времени в пределах нуклеотидной последовательности гена известно 1053 однонуклеотидных полиморфных вариантов, для 21 из которых показаны ассоциации с различными клиническими фенотипами (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Наибольшее внимание уделяется варианту rs5918, который рекомендован для включения в панели генетических маркеров тестирования предрасположенности к сердечно-сосудистым заболеваниям, тромбозам, акушерской патологии и чувствительности к антиагрегантам.

В связи с клинической значимостью полиморфного варианта rs5918 гена *ITGB3* в ФГБУ НИИ медицинской генетики (г. Томск) тестирование на носительство аллеля *PLA2* проходили 1374 человека русской национальности, проживающих в Сибирском регионе (г. Томск – 1044 человека, г. Кемерово – 330). Группа популяционного контроля состояла из 858 человек и включала 629 женщин и 229 мужчин, проживающих в г. Томске. Средний возраст обследованных составил 33.6 ± 6.6 года. Среди женщин популяцион-

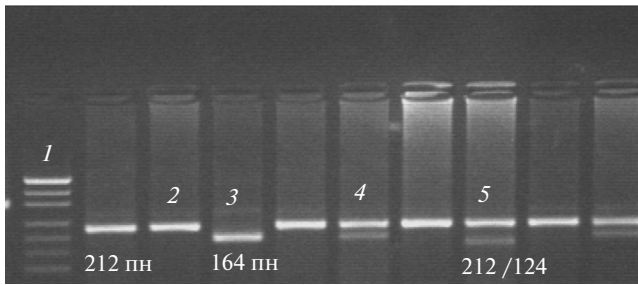


Рис. 1. Электрофореграмма генотипирования полиморфного варианта T196C (Leu33Pro, rs5918) гена *ITGB3*. 1 – маркер молекулярной массы рUC19; 2 – гомозигота по нормальному аллелю *PLA1/PLA1* (212 пн); 3 – гомозигота по мутантному аллелю *PLA2/PLA2* (164 пн); 4 – гетерозигота *PLA1/PLA2*; 5 – гетерозигота (нижний аллель с двумя мутациями T196C и T216G (Leu66Arg, rs36080296)).

ного контроля были 456 человек, проходивших генетическое тестирование в связи с планированием беременности без медицинских показаний, и 173 человека, принимавших участие в плановых медицинских осмотрах на предприятиях г. Томска. Все мужчины контрольной группы были отобраны из лиц, проходивших медицинские осмотры на предприятиях г. Томска.

В исследование также были включены две группы больных. В первую входили женщины ($N = 186$, г. Томск) с репродуктивными нарушениями, направленные в генетическую клинику ФГБУ НИИ медицинской генетики СО РАМН по медицинским показаниям. Среди них с невынашиванием беременности было 102 человека, с

бесплодием – 55, с гиперкоагуляцией – 29. Средний возраст обследованных составил 31.4 ± 5.0 лет. Во вторую группу были включены больные ишемической болезнью сердца с острым коронарным синдромом (ОКС) (227 мужчин и 103 женщины), проживающие в г. Кемерово. Средний возраст больных составил 58.5 ± 8.5 лет.

Генотипирование было выполнено с помощью стандартного ПДРФ анализа (праймеры: F – 5'-GGACTTCTCTTTGGGCTCCTG-3'; R – 5'-CACCTGCTTCAGGTCTCTCC-3'; фермент рестрикции *MspI*) с визуализацией фрагментов в 3%-ном агарозном геле, окрашенном бромистым этидием. В некоторых случаях на электрофореграммах был выявлен бэнд, не соответствующий по размерам аллелям *PLA1* (212 пн) и *PLA2* (164 пн) (рис. 1, трек 5). Для таких образцов было проведено секвенирование данного фрагмента ДНК с прямого и обратного праймеров (рис. 2).

В результате проведенного исследования выявлено, что распределение частот генотипов по полиморфному варианту rs5918 гена *ITGB3* во всех группах соответствует ожидаемому при равновесии Харди–Вайнберга. Частота редкого аллеля *PLA2* не различается в группах лиц, проживающих в г. Томске (14.7%) и г. Кемерово (15.0%) и находится в пределах значений, полученных для европеоидных популяций, где они колеблются от 14% до 16.2% (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Поскольку не было выявлено различий по частотам аллелей и генотипов между группами лиц, проживающих в Томске и Кемерово ($p = 0.925$; $p = 0.622$, соответственно), были выполнены сравнения данных показателей между больными

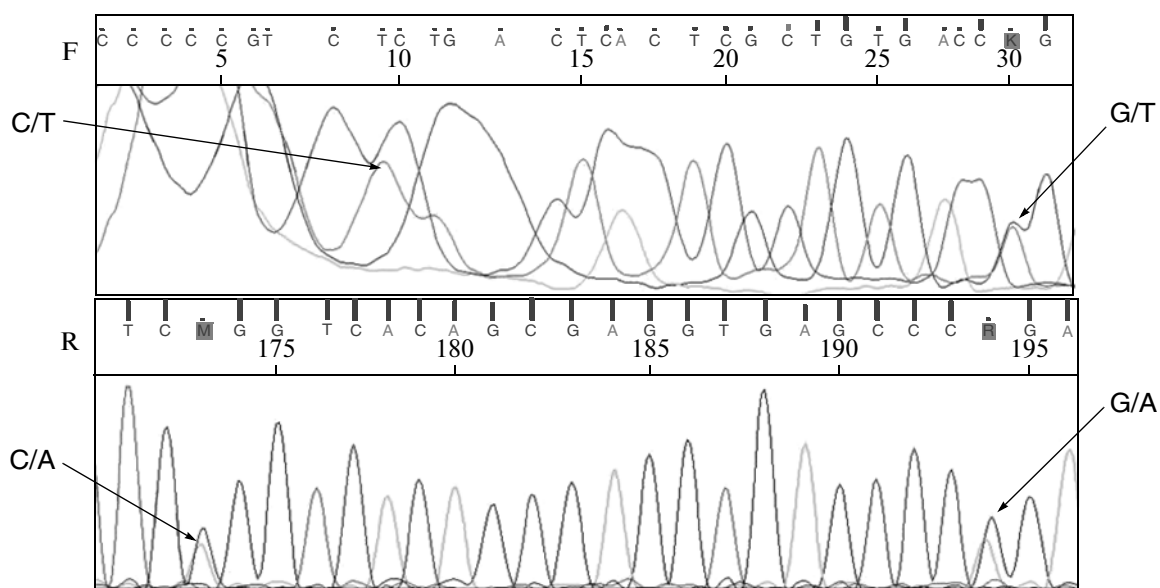


Рис. 2. Две нуклеотидные замены в гене *ITGB3* (прямая (F) и обратная (R) последовательности). На F-цепи замена T196C (Leu33Pro, rs5918) находится в самом начале сиквенса и читается не явно, более редкая замена T216G (Leu66Arg, rs36080296) читается четко; на R-цепи обе замены читаются отчетливо.

Таблица 1. Частоты аллелей и генотипов полиморфного варианта rs5918 гена *ITGB3* в различных группах лиц, проживающих в Сибирском регионе

Группы сравнения	Объем выборки	Частота, %			
		генотипов			аллеля
		<i>PLA1/PLA1</i>	<i>PLA1/PLA2</i>	<i>PLA2/PLA2</i>	<i>PLA2</i>
Популяционный контроль	858	72.4	25.7	1.9	14.7
женщины	629	71.7	26.2	2.1	15.2
мужчины	229	74.2	24.6	1.3	13.5
Больные ОКС	330	71.2	27.6	1.2	15.0
женщины	103	69.9	30.1	0.0	15.1
мужчины	227	71.8	26.4	1.8	15.0
Женщины с репродуктивными нарушениями	186	68.8	25.3	5.9	18.5
невынашивание	102	64.7	26.5	8.8	22.1
бесплодие	55	70.9	27.3	1.8	15.5
гиперкоагуляция	29	79.3	17.2	3.5	12.1
p^*		0.0009			0.017
p^\wedge		0.003			0.089

Примечание. p^* – уровень значимости, полученный методом χ^2 , при сравнении групп женщин с невынашиванием беременности и популяционного контроля; p^\wedge – уровень значимости, полученный двусторонним точным тестом Фишера, при сравнении групп женщин с невынашиванием беременности и ОКС.

с различными формами патологий и контрольной группой.

Не было выявлено различий в частотах аллелей и генотипов между больными ОКС и контрольной группой ($p = 0.925$; $p = 0.622$), а также между женщинами больными ОКС и здоровыми ($p = 0.956$; $p = 0.056$) и мужчинами больными ОКС и здоровыми ($p = 0.598$; $p = 0.811$) (табл. 1).

При сравнении частот аллелей и генотипов между группами женщин с репродуктивными нарушениями и контрольной группой было выявлено, что наибольшая частота “патологического” аллеля *PLA2* наблюдается у женщин с невынашиванием беременности (22.1%), что значимо отличается от частоты данного аллеля в контрольной группе (14.7%, $p = 0.017$), однако не отличается от значений, полученных для женщин с гиперкоагуляцией (12.1%, $p = 0.13$), несмотря на то что в этой выборке выявлена наименьшая частота *PLA2* среди всех исследованных групп (табл. 1).

Выявлены различия в распределении частот генотипов между группами женщин с репродуктивными нарушениями, больных ОКС и популяционным контролем (табл. 1). Данные различия наблюдаются за счет повышения частоты генотипа *PLA2/PLA2* у женщин с невынашиванием беременности (8.8%), которая статистически значимо отличается от частоты, полученной для кон-

трольной группы (2.1%, $p = 0.0009$) и женщин больных ОКС (0.0%, $p = 0.003$) (табл. 1). Полученные данные согласуются с результатами пилотного исследования, проведенного в Греции, которое показало, что вариант rs5918 гена *ITGB3* может быть ассоциирован со спонтанным прерыванием беременности на ранних сроках [7].

Секвенирование фрагмента, не соответствующего по размерам аллелям *PLA1* и *PLA2*, показало, что все образцы с неспецифическим бэндом наряду с полиморфным вариантом rs5918 содержали мутацию rs36080296 (T216G, Leu66Arg), наличие которой и приводило к появлению обнаруженного с помощью ПДРФ фрагмента длиной 124 пн (рис. 2).

Мутация rs36080296 в гетерозиготном состоянии была обнаружена у 14 человек: у 10 женщин из группы с репродуктивными нарушениями (9 – невынашивание беременности, 1 – гиперкоагуляция), у одной женщины, входящей в группу популяционного контроля, и у трех мужчин с ОКС (табл. 2). Следует отметить, что повышение частоты данной мутации характерно для лиц с различными патологическими состояниями. Так, в общей группе женщин с репродуктивными нарушениями частота варианта rs36080296 достигает 2.7%, а в группе с невынашиванием беременности 4.4%, что отличается от значений, полученных для женщин контрольной группы (0.08%). У

Таблица 2. Частота мутации rs36080296 в различных группах лиц Сибирского региона

Группы	Число обследованных лиц	Частота мутации rs36080296 (<i>n</i> (%))	<i>p</i>
Женщины (популяционный контроль)	629	1 (0.08)	—
Женщины с репродуктивными нарушениями	186	10 (2.7)	0.41×10^{-5}
Невынашивание беременности	102	9 (4.4)	0.2×10^{-6}
Бесплодие	55	0 (0)	—
Гиперкоагуляция	29	1 (1.7)	0.08
Мужчины (популяционный контроль)	229	0 (0)	—
Мужчины с ОКС	227	3 (0.66)	0.25

Примечание. *p* – уровень значимости, достигнутый двусторонним точным тестом Фишера при сравнении групп женщин с репродуктивными нарушениями с женщинами популяционного контроля и при сравнении мужчин с ОКС с группой мужчин популяционного контроля.

мужчин накопление данной мутации наблюдается в группе больных ОКС (0.6%), хотя различия с контрольной группой (0%) не достигают статистически значимых величин (табл. 2).

В базе NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) приводятся данные о частоте мутации rs36080296, которая находится в пределах от 0% до 2% в различных популяциях.

По данным Университета медицинской генетики и детского развития (Department of Medical Genetics and Child Development) г. Печ в Венгрии редкий аллель “G” варианта rs36080296 в популяции встречается с частотой 0.2%. Причем в комбинации с аллелем *PLA1* редкий аллель встречался с частотой 0.4%, а в сочетании с аллелем *PLA2* – с частотой 0.07% (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). В настоящем же исследовании выявлено, что во всех 14 случаях аллель “G” (T216G) встречался только в сочетании с аллелем *PLA2*. Результаты исследования SHGC, включающего 24 человека (6 человек европеоидного происхождения, 6 – афроамериканцы, 6 – жители стран Азии и 6 – испанцы), показали, что частота аллеля “G” rs36080296 в данной группе составила 2% (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). При проведении поиска публикаций, посвященных частоте данной мутации у лиц с различной патологией, не было обнаружено статей в базах данных <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> и <http://highwire.stanford.edu>.

Таким образом, в настоящем исследовании выявлено, что аллель *PLA2* и генотип *PLA2/PLA2* rs5918 гена *ITGB3* у русских женщин Сибирского региона ассоциированы с невынашиванием беременности. Частота мутации rs36080296 гена *ITGB3* у жителей Сибирского региона находится в пределах величин, полученных для групп лиц раз-

личных регионов мира. У женщин контрольной группы, проживающих в г. Томске, частота варианта rs36080296 подобна частоте, полученной в популяции Венгрии. Выявлено накопление данной мутации у женщин с невынашиванием беременности, что может свидетельствовать о возможном ее вкладе в предрасположенность к данной патологии, особенно в сочетании с аллелем *PLA2*. Кроме этого, вариант rs36080296 у мужчин может быть ассоциирован с ОКС, что требует дальнейшего изучения.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта ФЦП “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” на 2009–2013 годы для проведения исследований коллективами НОЦ (соглашение № 8062).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Knowles J.W., Wang H., Itakura H. et al. Association of polymorphisms in platelet and hemostasis system genes with acute myocardial infarction // *Am. Heart J.* 2007. V. 154. № 6. P. 1052–1058.
2. Kucharska-Newton A.M., Monda K.L., Campbell S. et al. Association of the platelet GPIIb/IIIa polymorphism with atherosclerotic plaque morphology: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study // *Atherosclerosis.* 2011. V. 216. № 1. P. 151–156.
3. Cayla G., Hulot J.S., O'Connor S.A. et al. Clinical, angiographic, and genetic factors associated with early-coronary stent thrombosis // *JAMA.* 2011. V. 306. № 16. P. 1765–1774.
4. Stankovic S., Majkic-Singh N. Genetic aspects of ischemic stroke: coagulation, homocysteine, and lipoprotein metabolism as potential risk factors // *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 2010. V. 47. № 2. P. 72–123.

5. Goodman T., Ferro A., Sharma P. Pharmacogenetics of aspirin resistance: a comprehensive systematic review // Br. J. Clin. Pharmacol. 2008. V. 66. № 2. P. 222–232.
6. Yenicesu G.I., Cetin M., Ozdemir O. et al. A prospective case-control study analyzes 12 thrombophilic genemutations in Turkish couples with recurrent pregnancy loss // Am. J. Reprod. Immunol. 2010. V. 63. № 2. P. 126–136.
7. Lambrinouadaki I., Armeni E., Kaparos G.J. et al. The frequency of early, spontaneous miscarriage associated with the leu33pro polymorphism of Glycoprotein IIIa: a pilot study // Aust. N. Z. J. Obstet Gynaecol. 2010. V. 5. № 5. P. 485–490.

Prevalence of Alleles of Polymorphic Variants Leu33Pro and Leu66Arg Gene *ITGB3* among Inhabitants of Siberia

I. A. Goncharova^{a, b}, N. P. Babushkina^a, L. I. Minaycheva^a, V. V. Markova^a,
E. V. Kulish^a, R. R. Salakhov^b, O. A. Makeeva^{a, b}, and V. P. Puzyrev^a

^a Research Institute of Medical Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences,
Tomsk, 63450 Russia

e-mail: irina.goncharova@medgenetics.ru

^b Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Siberian Branch of the Russian Academy
of Medical Sciences, Kemerovo, 650002 Russia

e-mail: reception@cardio.kem.ru

The frequency of the polymorphic variant T196C (Leu33Pro, rs5918) of *ITGB3* gene was studied in several groups of inhabitants of Siberia, including pregnant women with reproductive disorders ($n = 186$), patients with acute coronary syndrome ($n = 330$), and population control ($n = 858$). The frequency of the rare *PLA2* allele among residents of Tomsk and Kemerovo was 14.7 and 15.0% respectively. There were no differences in the allele and genotype frequencies of polymorphic variant between patients with acute coronary syndrome and the control group ($p = 0.925$, $p = 0.622$). The highest frequency of abnormal *PLA2* allele (22.1%) and the *PLA2/PLA2* genotype (8.8%) was observed among women, who had miscarried, which was significantly different from the frequency of this allele and genotype in the control group (14.7%, $p = 0.017$; 2.1%, $p = 0.0009$). Sequencing showed that all samples with the nonspecific band had the polymorphic rs5918 variant and rs36080296 mutations (T216G, Leu66Arg). The frequency of the rs36080296 mutation among the residents of Siberia was 0.51%. Among the women with reproductive disorders, the frequency of rs36080296 was 2.7%, while in the group who suffered from miscarriages, it was 4.4%; this was different from the frequency in the control group (0.08%, $p = 0.2 \times 10^{-6}$). The accumulation of mutations was also observed among men with acute coronary syndrome (0.6%), but the differences from the control group (0%) had no statistical significance.