

В.Ю. Гарбузова, В.Л. Гур'янова, О.М. Пархоменко, В.Є. Досенко, О.В. Атаман

## Частота алельних варіантів гена матриксного Gla-протеїну у хворих з гострим коронарним синдромом

*Наведено результати визначення частоти алельних варіантів гена матриксного-Gla-протеїну (MGP), що є одним з ключових білків-регуляторів кальцифікації, у 115 хворих з гострим коронарним синдромом (ГКС) і 110 здорових людей (контрольна група). Встановлено, що співвідношення нормальних гомозигот, гетерозигот і гомозигот із мінорним алелем при аналізі T<sup>-138</sup>→C-поліморфізму промотору гена MGP у хворих на ГКС становить: 59,8, 32,7, 7,5 % (у контролі – 58,7, 36,7, 4,6%, P > 0,05); при аналізі G<sup>-7</sup>→A-поліморфізму промотору – 42,1, 45,6 і 12,3 % та 41,8, 54,5, 3,6 % відповідно (P < 0,05 за  $\chi^2$ -критерієм); а при визначенні поліморфізму Thr<sub>83</sub>→Ala 4-го екзону – 42,6, 43,5 і 13,9 % порівняно з 43,9, 45,9, 10,2 % у контролі (P > 0,05). Одержані результати доводять, що A/A-варіант промотору гена MGP (G<sup>-7</sup>→A-поліморфізм) асоційований зі збільшенням ризику розвитку ГКС в українській популяції, а також свідчать про те, що інтенсивність кальцифікації впливає на перебіг атеросклеротичного ураження коронарних судин.*

*Ключові слова: матриксний Gla-протеїн, однонуклеотидний поліморфізм, інфаркт міокарда.*

### ВСТУП

Матриксний Gla-протеїн (MGP) – представник групи залежних від вітаміну К білків, що містять залишки  $\gamma$ -карбоксиглутамінової кислоти (Gla). До цієї групи належать білки, які беруть участь у коагуляції крові: протромбін, фактори VII, IX і X, протеїни C, S і Z, а також кістковий Gla-протеїн, відомий під назвою остеокальцин [1]. На відміну від специфічного для кісток остеокальцину, MGP експресується в багатьох тканинах, в тому числі в тканинах серця і стінок судин [2, 3]. Як *in vitro*, так і *in vivo* він перешкоджає відкладанню кальцію у м'яких тканинах, зокрема в артеріальній стінці [3, 5]. Цей ефект забезпечується наявністю у молекулі MGP Gla-залишків, здатних взаємодіяти з іонами кальцію та кристалами оксіапатиту. Молекула MGP (молекулярна маса 10 кДа) складається з 84 амінокислотних залишків, п'ять з яких представлено  $\gamma$ -карбоксиглутаміновою кислотою [4]. Залишки останньої утво-

рюються після посттрансляційної модифікації синтезованого в клітинах MGP, сутність якої полягає в карбоксилуванні глутамінової кислоти. Встановлено, що декарбоксильований MGP, у якому замість Gla міститься глутамінова кислота втрачає свою антикальцифікуючу активність [14].

Ген MGP у людини розташований на короткому плечі 12-ї хромосоми (12p13.1-p12.3). У ньому закодовано 84 амінокислотні залишки зрілого білка і 19 залишків трансмембранного сигнального пептиду. Довжина гена становить 3900 нуклеотидів, він складається з 4 екзонів, розділених трьома інтронами, на які припадає понад 80 % загальної його довжини [6]. Аналіз промоторної ділянки MGP-гена показав, що поряд з типовими TATA і CAT-боксами, вона містить послідовності, які, можливо, мають регуляторні властивості і є гомологічними раніше ідентифікованим елементам, що відповідають на дію гормонів і транскрипційних факторів. Зокрема, окрес-

© В.Ю. Гарбузова, В.Л. Гур'янова, О.М. Пархоменко, В.Є. Досенко, О.В. Атаман

лено дві ділянки промотору, що містять можливі сайти зв'язування з рецепторами ретиноевої кислоти і вітаміну D [6].

Серед багатьох (121 варіант) описаних однонуклеотидних поліморфізмів (SNP) у гені MGP людини найкраще досліджено три: T<sup>-138</sup>→C (rs1800802), G<sup>-7</sup>→A (rs1800801) та Thr<sub>83</sub>→Ala (rs4236) [7–13]. Поліморфізми T<sup>-138</sup>→C та G<sup>-7</sup>→A знаходяться у промоторній частині гена – ділянці, яка утворює комплекси з ядерними білками і сприяє їх регуляторні впливи. Thr<sub>83</sub>→Ala-поліморфізм локалізований у четвертому екзоні, що кодує Gla-місткий домен та спричинює заміну амінокислоти в цьому протеїні.

Враховуючи можливий вплив MGP на розвиток кальцифікації артеріальних судин, що вважається однією з провідних ознак їх дегенерації, можна припустити, що генетичний поліморфізм промоторної ділянки може впливати на рівень експресії гена MGP, а варіабельність 4-го екзону – на якісні характеристики білка. Літературні дані з цього приводу неоднозначні та суперечливі [7–10, 12, 13], що спонукало нас до проведення дослідження в українській популяції, метою якого став пошук зв'язку між різними алельними варіантами гена MGP і ймовірністю розвитку гострого коронарного синдрому (ГКС).

## МЕТОДИКА

Дослідження проведено із використанням венозної крові 115 хворих з ГКС (81,7 % чоловіків і 18 % жінок) віком від 40 до 83 років – середній вік (58,5 ± 0,7) роки, шпиталізованих у відділення реанімації та інтенсивної терапії Національного наукового центру “Інститут кардіології імені академіка М.Д. Стражеска” НАМН України. Кінцевий діагноз нестабільної стенокардії поставлено 33,5 % хворим, гострого інфаркту міокарда – у 66,5 % пацієнтів. На підставі результатів клінічних, електрокардіографічних і біохімічних обстежень,

відповідно до рекомендацій європейського та американського товариств кардіологів [18–20]. Контрольна група складалася з 110 практично здорових донорів, у яких відсутність серцево-судинної патології підтверджували за допомогою анамнезу, зняття електрокардіограми і вимірювання артеріального тиску. Контрольна група і група хворих не відрізнялися за віком і співвідношенням осіб різної статі (P > 0,05 за χ<sup>2</sup>-критерієм).

Для генотипування венозну кров набирали в стерильних умовах в моновети об'ємом 2,7 мл з калієвою сіллю етилендіамінтетраоцтової кислоти (“Sarstedt”, Німеччина), що була антикоагулянтном. Кров заморожували і зберігали при -20°C. ДНК з неї виділяли, використовуючи набори “Изоген” (Росія). Методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з наступним аналізом довжини рестрикційних фрагментів визначали T<sup>-138</sup>→C-поліморфізм промотору (rs1800802). Для цього ампліфікували ділянку промотору вказаного гена за допомогою пари специфічних праймерів: прямого (sense) – 5'-AAGCATACGATGGC CAAAАСТТСТGCA-3' і зворотного (anti-sense) – 5'-GAАСТAGCАТТGGAAСТТТТ СССААСС-3'. Праймери було синтезовано фірмою “Metabion” (Німеччина). Для ампліфікації брали 50–100 нг ДНК і додавали до суміші, що містила 5 мкл 5-кратного ПЛР-буфера, 1,5 ммоль/л сульфату магнію, 200 мкмоль/л суміші чотирьох нуклеотидтрифосфатів, по 20 пмоль кожного з праймерів і 0,5 ОД Taq-полімерази (“Ферментас”, Литва), об'єм доводили до 25 мкл деіонізованою водою. ПЛР проводили в термоциклері GeneAmp PCR System 2700 (“Applied Biosystems”, США). Ампліфікація фрагмента промотору складалася з 33 циклів: денатурація – 94°C (30 с), гібридизація праймерів – 57°C (1 хв) і елонгація – 72°C (1 хв). Пізніше 6 мкл продукту ампліфікації фрагмента промотору інкубували при 37°C протягом 18 год

з 3 ОД рестриктази *BseNI* (“Ферментас”, Литва) у буфері В такого складу: 10 ммоль/л тріс-НСІ (рН 7,5), 10 ммоль/л хлориду магнію і 0,1 мг/мл альбуміну. Якщо в -138 позиції гена *MGP* містився тимін, ампліфікат, який складався з 142 пар основ, розщеплювався рестриктазою *BseNI* на два фрагменти – 118 і 24 пари основ. У разі заміни тиміну на цитозин сайт рестрикції для *BseNI* втрачався і утворювався один фрагмент розміром 142 пари основ (рис. 1,а).

Аельний поліморфізм промотору гена *MGP*  $G^{-7} \rightarrow A$  (rs1800801) визначали також за допомогою ампліфікації фрагмента та наступної рестрикції. Послідовність нуклеотидів у специфічних праймерах була такою: прямий (sense) – 5'-СТАG TTCAGT GCCAACCCCTCCCCACC-3', зворотний (antisense) – 5'-TAGCAGCA GTAGGGA GAGAGGCTCCCA-3'. Для ампліфікації брали 50–100 нг ДНК і додавали до суміші, що містила 5 мкл 5-кратного ПЛР-буфера, 1,5 ммоль/л сульфату магнію, 200 мкмоль/л суміші чотирьох нуклеотидтрифосфатів, по 20 пмоль кожного з праймерів і 0,75 ОД Таq-полімерази (“Ферментас”, Литва), об’єм доводили до 25 мкл деіонізованою водою. Ампліфікація фрагмента, що містив стар-

тову ділянку, складалася з 33 циклів: денатурація – 94°C (50 с), гібридизація праймерів – 64,5°C (45 с) та елонгація – 72°C (1 хв). Для рестрикційного аналізу 6 мкл продукту ампліфікації інкубували при 37°C протягом 18 год з 2 ОД рестриктази *NcoI* у буфері Tango такого складу: 33 ммоль/л тріс-ацетату (рН 7,9), 10 ммоль/л ацетату магнію, 66 ммоль/л ацетату калію, 0,1 мг/мл альбуміну. Якщо в -7 позиції гена *MGP* містився гуанін, ампліфікат, який складався з 500 пар основ, розщеплювався рестриктазою *NcoI* на два фрагменти – 240 і 260 пар основ. У разі заміни гуаніну на аденін сайт рестрикції для *NcoI* втрачався та візуалізувався один фрагмент завдовжки 500 пар основ (див. рис. 1,б).

Для визначення поліморфізму 4-го екзону  $Thr_{83} \rightarrow Ala$  (rs4236) гена *MGP* використовували пару специфічних праймерів: прямий (sense) – 5'-ТСААТАGГGAAGC СТGTGATG-3' і зворотний (antisense) – 5'-AGGGGGАТАСААААТСАGGTG-3'. Програма ампліфікації була такою: денатурація – 94°C (50 с), гібридизація праймерів – 64,5°C (45 с), елонгація – 72°C (1 хв), разом 33 цикли. Надалі 6 мкл продукту ампліфікації інкубували при 37°C протягом 18 год

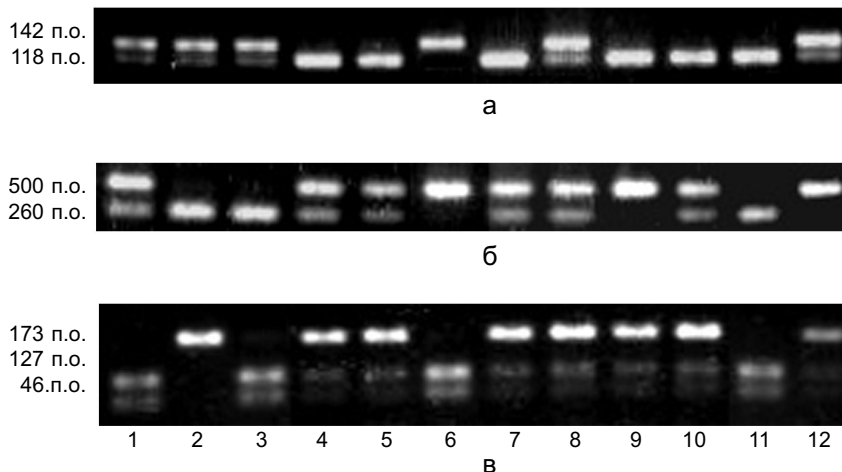


Рис. 1. Результати рестрикційного аналізу одностандартних поліморфізмів гена *MGP*: а –  $T^{-138} \rightarrow C$ -поліморфізм (доріжки 4, 5, 7, 9, 10, 11 відповідають Т/Т-генотипу, 1, 2, 3, 8, 12 – Т/С-генотипу, 6 - С/С-генотипу); б –  $G^{-7} \rightarrow A$ -поліморфізм (доріжки 2, 3, 11 відповідають G/G-генотипу, 1, 4, 5, 7, 8, 10 – G/A-генотипу, 6, 9, 12 – A/A-генотипу); в –  $Thr_{83} \rightarrow Ala$ -поліморфізм (доріжки 1, 3, 6, 11 відповідають Thr/Thr-варіанту, 4, 5, 7–10, 12 – Thr/Ala-варіанту, 2 – Ala/Ala-варіанту); п.о. – пара основ

з 3 ОД рестриктази Eco477 у буфері R такого складу: 10 ммоль/л тріс-НСІ (рН 8,5), 10 ммоль/л хлориду магнію, 100 ммоль/л хлориду калію і 0,1 мг/мл альбуміну. Наявність у 3748 позиції гена MGP аденіну перешкоджає рестрикції, а при заміні його на тимін рестриктаза розщеплює ампліфіковану ділянку 4-го екзону (довжина – 173 пари азотистих основ) на два фрагменти: 127 і 46 пар основ (див. рис. 1,в).

Ампліфікати всіх трьох вивчених фрагментів гена MGP після рестрикції розділяли в 2,5%-му агарозному гелі, що містив бромистий етидій. Горизонтальний електрофорез (0,1А; 140V) проводили протягом 25 хв ( $T^{-138} \rightarrow C$ ), 40 хв ( $G^{-7} \rightarrow A$ ) та 20 хв ( $Thr_{83} \rightarrow Ala$ ). Візуалізацію ДНК після електрофорезу здійснювали за допомогою транслюмінатора ("Біоком", Росія).

Одержані результати опрацьовували статистично з використанням програми Excel 2000. При цьому достовірність відмінностей визначали за  $\chi^2$ -критерієм. Значення  $P < 0,05$  вважали достовірним.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Генотипування хворих із ГКС за трьома сайтами гена MGP і порівняння одержаних результатів з такими рестрикційного аналізу в контрольній групі дало змогу встановити, що частота, з якою зустрічаються певні варіанти цього гена, є різною при  $G^{-7} \rightarrow A$ -поліморфізмі і статистично не відрізняється, коли йдеться про поліморфізми  $T^{-138} \rightarrow C$  та  $Thr_{83} \rightarrow Ala$  (рис. 2). Встановлено, що співвідношення гомозигот за мажорним алелем, гетерозигот і гомозигот за міноним алелем при аналізі  $T^{-138} \rightarrow C$ -поліморфізму промотору складало у хворих з ГКС: 59,8, 32,7, 7,5 %, а в контрольній групі – 58,7, 36,7, 4,6 % ( $P > 0,05$  за  $\chi^2$ -критерієм). Частота алейних варіантів при вивченні  $G^{-7} \rightarrow A$ -поліморфізму становила 42,1, 45,6, 12,3 % і 41,8, 54,5, 3,6 % відповідно ( $P < 0,05$ ). А при аналізі поліморфізму  $Thr_{83} \rightarrow Ala$  – 42,6,

43,5, 13,9 % і 43,9, 45,9, 10,2 % відповідно ( $P > 0,05$ ). Таким чином, достовірні відмінності при порівнянні з контрольною групою було встановлено тільки для поліморфізму в промоторі  $G^{-7} \rightarrow A$ : у хворих з ГКС міноним („патологічний”) варіант А/А вияв-

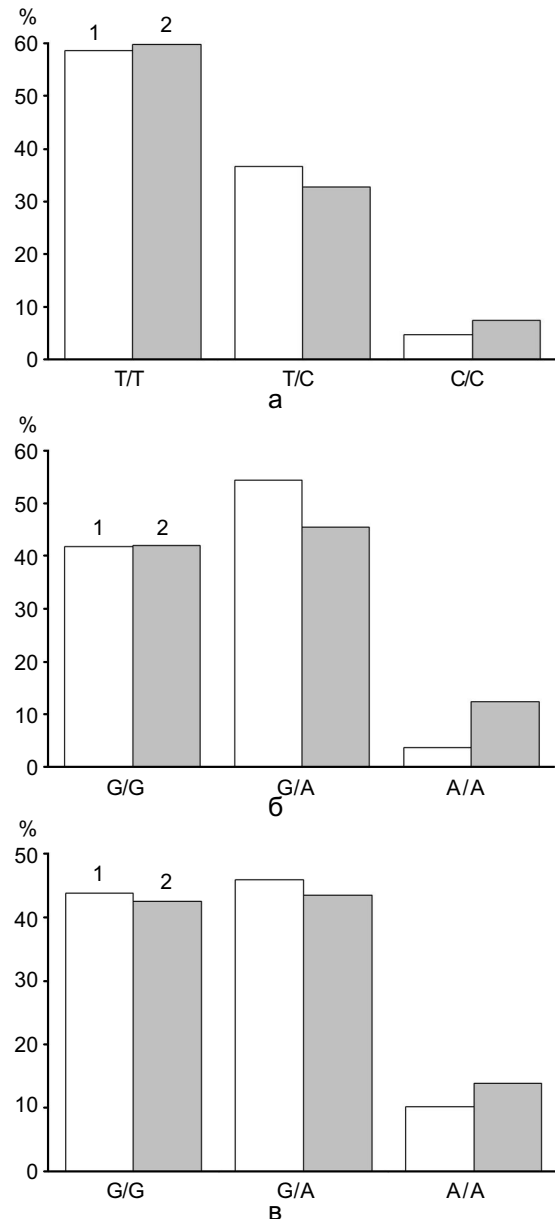


Рис. 2. Частота різних генотипів при визначенні однонуклеотидних поліморфізмів гена MGP у практично здорових індивідумів (1) та хворих із гострим коронарним синдромом (2): а –  $T^{-138} \rightarrow C$ -поліморфізм ( $P > 0,05$  за  $\chi^2$ -критерієм), б –  $G^{-7} \rightarrow A$ -поліморфізм ( $P < 0,05$  за  $\chi^2$ -критерієм), в –  $Thr_{83} \rightarrow Ala$ -поліморфізм ( $P > 0,05$  за  $\chi^2$ -критерієм)

ляли в 3,4 раза частіше, ніж у донорів.

Від часу встановлення антикальцифікуючих властивостей MGP постало питання, яку роль відіграє цей білок у розвитку кальцифікації артеріальної стінки, зокрема атеросклеротичних бляшок у людини. Досліджували два основні напрямки. З одного боку, вивчають молекулярно-генетичний вплив однонуклеотидних поліморфізмів у промоторі на ефективність транскрипції із застосування люциферазного тесту. З другого, дослідники шукають функціональне значення однонуклеотидних поліморфізмів, використовуючи на клінічний матеріал, вивчаючи зв'язок рівня MGP крові та розвитку атеросклеротичних змін [21–23], поліморфізмів у гені MGP і деяких інших показників ураження артерій [7–10, 12, 13].

Поліморфізм гена MGP та активність транскрипції. Перше дослідження із застосуванням люциферазного тесту, суть якого полягає у введенні в культивовані клітини генетичних конструкцій, що містять “нормальний” або “патологічний” варіанти промотору MGP та ген люциферази, було проведено Негтманн та співавт. [7]. Автори показали, що поліморфізм  $G^{-7} \rightarrow A$  не впливає на промоторну активність, тоді як активність промотору з мінорним алелем -138C („патологічний” варіант) порівняно з -138T („нормальним” варіантом) була менша на 20 % у гладеньком'язових клітинах (ГМК) судин щура і на 50 % у культивованих фібробластах людини. Зовсім інші дані було отримано у дослідженні Farzaneh та співавт. [8]. Автори встановили, що промотори з поліморфізмами  $G^{-7} \rightarrow A$  і  $T^{-138} \rightarrow C$  істотно змінюють транскрипційну активність гена MGP в судинних ГМК щурів у культурі. Так, варіант промотору з мінорним алелем -7A виявляв у 1,5 раза вищу активність, ніж -7G, а варіант -138C був у 4 рази активніший за -138T. Аналіз промотору гена MGP показав, що поліморфізм  $T^{-138} \rightarrow C$  стосується ділянки, яка є критичною

для процесів транскрипції в судинних ГМК. Саме тут, у позиції між -142 і -136, розташований елемент, що може зв'язувати активаційний протеїн-1 (AP-1). Встановлено, що при поліморфізмі  $T^{-138} \rightarrow C$  змінюється зв'язування цієї ділянки промотору з комплексом AP-1. Варіант промотору з алелем -138T добре зв'язує комплекси AP-1, до складу яких входять c-Jun, JunB, Fra-1 і Fra-2, і активується форболовими сполуками, тим часом здатність до зв'язування AP-1 і наступної активації у промотору з алелем -138C є дуже низькою. Наведені вище результати підтверджуються Kobayashi та співавт. [9], які встановили, що варіант промотору -138T, на відміну від -138C, здатний утворювати комплекси з ядерними білками (AP-1). Про те що стосується активності цих варіантів, то японські дослідники дійшли зовсім інших, ніж Farzaneh та співавт., висновків: при введенні промоторів гена MGP у культивовані клітини раку молочної залози людини активність промотору з алелем -138T була набагато вищою, якщо порівнювати з алелем -138C.

Щодо другої групи робіт, то одержані в них результати теж суперечливі. Так, Вгаам та співавт. [21] наводять дані про те, що розвиток тяжкого атеросклерозу супроводжується збільшенням концентрації MGP у сироватці крові. Натомість Јоно та співавт. [22] встановили, що цей показник в крові обернено пропорційно корелює з кальцифікацією коронарних судин. І нарешті, О'Donell та співавт. [23], показавши зв'язок між рівнем MGP крові і низкою факторів ризику атеросклерозу, не виявили кореляції між вмістом MGP і кальцифікацією коронарних артерій.

Дані про зв'язок різних видів алельного поліморфізму гена MGP з рівнем MGP крові, розвитком кальцифікації артерій (зокрема коронарних) і наслідків атеросклерозу (зокрема інфаркту міокарда) теж суперечливі.

Поліморфізм гена MGP і його вміст у крові. У праці Farzaneh та співавт. [8] не виявлено асоціації між  $G^{-7} \rightarrow A$ -поліморфізмом і вмістом MGP у сироватці крові здорових людей (Нідерланди). Водночас у цьому дослідженні встановлено статистично достовірний зв'язок між вище зазначеним показником і  $T^{-138} \rightarrow C$ -поліморфізмом: найвищі значення MGP виявляли в C/C, найменші – у T/T-гомозигот, проміжні значення були в гетерозигот (T/C). На відміну від наведеного вище, Crosier та співавт. [13], не виявили асоціації між  $T^{-138} \rightarrow C$ -поліморфізмом і рівнем MGP сироватки, натомість показано статистично достовірний зв'язок між  $G^{-7} \rightarrow A$ - і  $Thr_{83} \rightarrow Ala$ -варіантами поліморфізму у здорових чоловіків і жінок (мешканці США), з одного боку, і концентрацією MGP крові, з другого. У гомозигот за мінорним алелем концентрація MGP була найменшою, у нормальних гомозигот – найбільшою, у гетерозигот реестрували проміжні значення цього показника.

Поліморфізм гена MGP і кальцифікація артерій. Crosier та співавт. [13] показали, що всі три SNP ( $T^{-138} \rightarrow C$ ,  $G^{-7} \rightarrow A$  та  $Thr_{83} \rightarrow Ala$ ) мають зв'язок з кальцифікацією коронарних артерій (ККА) у чоловіків як самостійно, так і в поєднанні з іншими факторами ризику атеросклерозу. Водночас статистично достовірної асоціації цих самих SNP з ККА у жінок не виявлено. Найбільш асоційованими з ККА були гомозиготи за мінорним алелем. У чоловіків з таким генотипом при всіх трьох SNP важкість ККА була достовірно нижчою, ніж у гомозигот за основним алелем. Автори дійшли висновку, що, незважаючи на виявлений зв'язок між поліморфізмом гена MGP і його вмістом у сироватці крові, з одного боку, і розвитком ККА, з другого, два останні показники між собою ніяк не пов'язані. На думку авторів, генетичні варіанти гена MGP впливають на ККА не через концентрацію MGP в сироватці крові, а в інший, ще невідомий спосіб.

Дуже слабкий зв'язок між поліморфізмом MGP і кальцифікацією артерій було виявлено при дослідженні сонних і стегнових артерій у здорових волонтерів ("АХА Study", Франція) [7]. Тільки серед тих, у кого при ультразвуковому дослідженні виявлено атеросклероз стегнових артерій з кальцифікацією бляшок, алелі -7A та Ala83 зустрічалися частіше, ніж у суб'єктів, що мали бляшки без ознак їх кальцифікації. Не встановлено жодного зв'язку між алельним поліморфізмом MGP і атеросклерозом сонних артерій.

В інших кількох дослідженнях не виявили зв'язку  $T^{-138} \rightarrow C$  поліморфізму з кальцифікацією коронарних артерій [12], а також атеросклерозом черевної аорти, кальцифікацією атеросклеротичних бляшок і артеріосклерозом Менкеберга [9].

Поліморфізм гена MGP і інфаркт міокарда. Лише в одному дослідженні (ЕСТІМ Study, Північна Ірландія, Франція) аналізували зв'язок 6 варіантів гена MGP з розвитком інфаркту міокарда [7]. Було показано, що частота алелів і розподіл генотипів за всіма видами SNP однакові у хворих на інфаркт міокарда і в контрольній групі. Тільки в одній підгрупі, у якій хворих і контрольних суб'єктів було поділено на таких, що мають високий і низький ризик розвитку ішемічної хвороби серця, встановлено, що частота мінорних алелів (-7A і Ala83) у хворих на інфаркт міокарда з низьким рівнем факторів ризику є більшою, ніж у відповідній контрольній підгрупі.

У виконаних нами дослідженнях показано, що в групі хворих з ГКС, що є найбільш небезпечною формою ішемічної хвороби серця, частота алеля -7A була вищою, ніж у контрольній групі. Це дає підстави думати, що  $G^{-7} \rightarrow A$ -поліморфізм стосується розвитку саме цієї форми ішемічної хвороби серця в українській популяції і може розглядатися як один з генетичних чинників серцево-судинної патології. Механізми реалізації цього

генетичного фактора можуть бути пов'язані не тільки зі впливом на кальцифікацію коронарних артерій, але й на згортання крові [24]. Як зазначалося вище, MGP є вітамін К-залежним протеїном з родини прокоагулянтних білків крові (протромбін, VII фактор тощо), а, отже, може впливати на згортання крові, яке має надзвичайно велике значення в патогенезі коронарного тромбозу. На антагоністичний характер взаємодії коагуляції та кальцифікації судинної стінки вказують дані літератури [25, 26], а MGP може розглядатися як сполучна ланка у цих процесах. Крім того, активний, чітко відрегульований характер кальцифікації [5, 16, 17, 27–29] може вказувати на її пристосувальне значення в патогенезі атеросклерозу. Не виключено, що обвапнення є оптимальним варіантом закінчення патологічного процесу в судинній стінці, і фактори, що затримують відкладання кальцію, мають розглядатися як фактори ризику дестабілізації атеросклеротичної бляшки. До таких факторів ми схильні зарахувати і  $G^{-7} \rightarrow A$ -поліморфізм гена MGP, що значно частіше зустрічається у хворих на ГКС.

**В.Ю. Гарбузова, В.Л. Гурьянова,  
А.Н. Пархоменко, В.Е. Досенко, А.В. Атаман**

#### **ЧАСТОТА АЛЛЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНА МАТРИКСНОГО GLA-ПРОТЕИНА У БОЛЬНЫХ С ОСТРЫМ КОРОНАРНЫМ СИНДРОМОМ**

Представлены результаты определения частоты аллельных вариантов гена матричного-Gla-протеина (MGP), который является одним из ключевых белков-регуляторов кальцификации, у 115 больных с острым коронарным синдромом (ОКС) и 110 здоровых индивидуумов (контрольная группа). Установлено, что соотношение нормальных гомозигот, гетерозигот и минорных гомозигот при анализе  $T^{-138} \rightarrow C$ -поліморфізма промотора у гена MGP у больных с ОКС по сравнению с контрольной группой составляет: 59,8, 32,7, 7,5 % (в контроле – 58,7, 36,7, 4,6 %,  $P > 0,05$ ); при анализе  $G^{-7} \rightarrow A$ -поліморфізма промотора – 42,1, 45,6, 12,3 % и 41,8, 54,5, 3,6 % соответственно ( $P < 0,05$  по  $\chi^2$ -критерию); а при определении поліморфізма  $Thr_{83} \rightarrow Ala$  4-го экзона – 42,6, 43,5 и 13,9 % по

сравнению с 43,9, 45,9, 10,2 % – в контроле ( $P > 0,05$ ). Полученные данные позволяют утверждать, что вариант A/A промотора гена MGP ( $G^{-7} \rightarrow A$ -поліморфізм) ассоциирован с увеличением вероятности развития ОКС в украинской популяции, а также являются свидетельством того, что интенсивность процесса кальцификации влияет на течение атеросклеротического поражения коронарных сосудов.

Ключевые слова: матриксный Gla-протеин, однонуклеотидный полиморфизм, инфаркт миокарда.

**V.Yu. Garbuzova, V.L. Gurianova,  
A.N. Parkhomenko, V.E. Dosenko, A.V. Ataman**

#### **THE FREQUENCY OF ALLELIC POLYMORPHISM OF MATRIX GLA-PROTEIN GENE IN ACUTE CORONARY SYNDROME PATIENTS**

Allelic polymorphisms of matrix Gla protein (MGP) gene were determined in 115 patients with acute coronary syndrome (ACS) and in 110 practically healthy people. It was shown that interrelation of major homozygotes, heterozygotes and minor homozygotes by  $T^{-138} \rightarrow C$  MGP promoter polymorphism in patients with ACS were 59,8%, 32,7%, 7,5% and in control 58.7%, 36.7%, 4.6% ( $P > 0.05$  by  $\chi^2$ -test); by  $G^{-7} \rightarrow A$  polymorphism: 42.1%, 45.6%, 12.3% and 41.8%, 54.5%, 3.6% correspondingly ( $P < 0,05$ ); and by  $Thr_{83} \rightarrow Ala$  exon 4 polymorphism: 42.6%, 43.5%, 13.9% compared to 43.9%, 45.9%, 10.2% in control ( $P > 0.05$ ). The obtained data show that MGP A/A variant of MGP promoter  $G^{-7} \rightarrow A$  polymorphism is a risk factor of ACS in Ukrainian population. These data indicate also that the intensity of calcification influences atherosclerotic injury of coronary artery.

*Sumy State University, Sumy;*

*O.O.Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;*

*National Scientific Center "Srtazhesko Institute of Cardiology" NAMS of Ukraine, Kyiv*

#### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Price P.A., Urist M.R., Otawara Y. Matrix Gla protein, a new  $\gamma$ -carboxyglutamic acid-containing protein which is associated with the organic matrix of bone // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1983. – **117**. – P. 765–771.
2. Fraser J.D., Price P.A. Lung, heart, and kidney express high levels of mRNA for the vitamin K-dependent matrix Gla protein // *J. Biol. Chem.* – 1988. – **263**. – P. 11033–11036.
3. Price P.A., Faus S.A., Williamson M.K. Warfarin-induced artery calcification is accelerated by growth and vitamin D // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2000. – **20**. – P. 317–327.

4. Price P.A., Williamson M.K. Primary structure of bovine matrix Gla protein, a new vitamin K-dependent bone protein // *J. Biol. Chem.* – 1985. – **260**. – P. 14971–14975.
5. Proudfoot D., Shanahan C.M. Molecular mechanisms mediating vascular calcification: role of matrix Gla protein // *Nephrology (Carlton)*. – 2006. – **11**. – P. 455–461.
6. Cancela L., Hsieh C.-L., Francket U., Price P.A. Molecular structure, chromosome assignment, and promoter organization of the human matrix Gla protein gene // *J. Biol. Chem.* – 1990. – **265**. – P. 15040–15048.
7. Herrmann S.M., Whatling C., Brand E., Nikaud V., Gariepy J., Simon A., Evans A., Ruidavets L.B., Arveiler D., Luc G., Tiret L., Henney A., Cambien F. Polymorphisms of the human matrix Gla protein (MGP) gene, vascular calcification, and myocardial infarction // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2000. – **20**. – P. 2386–2393.
8. Farzaneh-Far A., Davies J.D., Braam L.A., Spronk H.M., Proudfoot D., Chan S.W., O'Shaughnessy K.M., Weissberg P.L., Vermeer C., Shanahan C.M. A Polymorphism of the human matrix r-carboxyglutamic acid protein promoter alters binding of an activating protein-1 complex and is associated with altered transcription and serum levels // *J. Biol. Chem.* – 2001. – **276**. – P. 32466–32473.
9. Kobayashi N., Kitazawa R., Maeda S., Schurgers L.J., Kitazawa S. T-138C polymorphism of matrix Gla protein promoter alters its expression but is not directly associated with atherosclerotic vascular calcification // *Kobe J. Med. Sci.* – 2004. – **50**. – P. 69–81.
10. Brancaccio D., Biondi M.L., Gallieni M., Turri O., Galassi A., Cecchini F., Russo D., Andreucci V., Cozzolino M. Matrix GLA protein gene polymorphisms: clinical correlates and cardiovascular mortality in chronic kidney disease patients // *Amer. J. Nephrol.* – 2005. – **25**. – P. 548–552.
11. Hernandez-Pacheco G., Murguia L.E., Rodriguez-Perez J.M., Fragoso J.M., Perez-Vielma N., Martinez-Rodriguez N., Granados J., Vargas-Alarcyn G. Matrix gamma-carboxyglutamic acid protein (MGP) G-7A and T-138C gene polymorphisms in Indian (Mayo and Teenek) and Mestizo populations from Mexico // *Hum. Biol.* – 2005. – **77**. – P. 385–391.
12. Taylor B.C., Schreiner P.J., Doherty T.M., Fornage M., Carr J.J., Sidney S. Matrix Gla protein and osteopontin genetic associations with coronary artery calcification and bone density: the CARDIA study // *Hum. Genet.* – 2005. – **116**. – P. 525–528.
13. Crosier M.D., Booth S.L., Peter I., Dawson-Hughes B., Price P.A., O'Donnell C.J., Hoffmann U., Williamson M.K., Orдовas J.M. Matrix Gla protein polymorphisms are associated with coronary artery calcification // *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* – 2009. – **55**. – P. 59–65.
14. Schurgers L.J., Teunissen K.J.F., Knapen M.H.J., Kwaijtaal M., van Diest R., Appels A., Reutelingsperger C.P., Cleutjens J.P.M., Vermeer C. Novel conformation-specific antibodies against matrix gamma-carboxyglutamic acid (Gla) protein // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2005. – **25**. – P. 1629–1633.
15. Stanford W. Coronary artery calcification as an indicator of preclinical coronary artery disease // *Radiographics.* – 1999. – **19**. – P. 1409–1419.
16. Shanahan C.M., Proudfoot D., Tyson K.L., Cary N. R. B., Edmonds M., Weissberg P. L. Expression of mineralisation-regulating proteins in association with human vascular calcification // *Z. Kardiol.* – 2000. – **89**, Suppl. 2. – P. II/63–II/68.
17. Giachelli C.M. Vascular calcification mechanisms // *J. Amer. Soc. Nephrol.* – 2004. – **15**. – P. 2959–2964.
18. Bertrand ME, Simoons ML, Fox KA, Wallentin LC, Hamm CW, McFadden E, De Feyter PJ, Specchia G, Ruzyllo W. Management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. The Task Force on the Management of Acute Coronary Syndromes of the European Society of Cardiology // *Eur. Heart J.* – 2002. – **23**. – P.1809–1840.
19. Antman E.M., Hand M., Armstrong P.W., Bates E.R., Green L.A., Halasyamani L.K., Hochman J.S., Krumholz H.M., Lamas G.A., Mullany C.J., Pearle D.L., Sloan M.A., Smith S.C. Jr; 2004 Writing Committee Members, Anbe D.T., Kushner F.G., Ornato J.P., Jacobs A.K., Adams C.D., Anderson J.L., Buller C.E., Creager M.A., Ettinger S.M., Halperin J.L., Hunt S.A., Lytle B.W., Nishimura R., Page R.L., Riegel B., Tarkington L.G., Yancy C.W. ACC/AHA guidelines for the management of patients with ST-elevation myocardial infarction // *J. Amer. Coll. Cardiol.* – 2004. – **44**. – P.E1–211.
20. Thygesen K., Alpert J.S., White H.D.; Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Redefinition of Myocardial Infarction, Jaffe A.S., Apple F.S., Galvani M., Katus H.A., Newby L.K., Ravkilde J., Chaitman B., Clemmensen P.M., Dellborg M., Hod H., Porela P., Underwood R., Bax J.J., Beller G.A., Bonow R., Van der Wall E.E., Bassand J.P., Wijns W., Ferguson T.B., Steg P.G., Uretsky B.F., Williams D.O., Armstrong P.W., Antman E.M., Fox K.A., Hamm C.W., Ohman E.M., Simoons M.L., Poole-Wilson P.A., Gurfinkel E.P., Lopez-Sendon J.L., Pais P., Mendis S., Zhu J.R., Wallentin L.C., Fernandez-Aviles F., Fox K.M., Parkhomenko A.N., Priori S.G., Tendera M., Voipio-Pulkki L.M., Vahanian A., Camm A.J., De Caterina R., Dean V., Dickstein K., Filippatos G., Funck-Brentano C., Hellemans I., Kristensen S.D., McGregor K., Sechtem U., Silber S., Tendera M., Widimsky P., Zamorano J.L., Morais J., Brener S., Harrington R., Morrow D., Lim M., Martinez-Rios M.A., Steinhubl S., Levine G.N., Gibler W.B., Goff D., Tubaro M., Dudek D., Al-Attar N. Universal definition of myocardial infarction // *European Heart J.* – 2007. – **28**. – P.2525–2538.
21. Braam L.A., Dissel P., Gijsbers B.L., Spronk H.M.H., Hamulyak K., Soute B.A.M., Debie W., Vermeer C. Assay for human matrix Gla protein in serum. Potential



- applications in the cardiovascular field // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2000. – **20**. – P. 1257–1261.
22. Jono S., Vermeer C., Dissel P., Hasegawa K., Shioi A., Taniwaki H., Kizu A., Nishizawa Y., Saito S. Matrix Gla protein is associated with coronary artery calcification as assessed by electron-beam computed tomography // *Thromb. Haemost.* – 2004. – **91**. – P. 790–794.
23. O'Donnell C.J., Kyla Shea M., Price P.A., Gagnon D.R., Wilson P.W.F., Larson M.G., Kiel D.P., Hoffmann U., Ferencik M., Clouse M.E., Williamson M.K., Cupples L.A., Dawson-Hughes B., Booth S.L. Matrix Gla protein is associated with risk factors for atherosclerosis but not with coronary artery calcification // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2006. – **26**. – P. 2769–2774.
24. Krueger T., Westenfeld R., Schurgers L.J., Brandenburg V.M. Coagulation meets calcification: The vitamin K system // *Int. J. Artif. Organs.* – 2009. – **32**. – P. 67–74.
25. Wallin R., Schurgers L., Wajih N. Effects of the blood coagulation vitamin K as an inhibitor of arterial calcification // *Thromb. Res.* – 2008. – **122**. – P. 411–417.
26. Uotila L. The metabolic functions and mechanism of action of vitamin K // *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* – 1990. – **201**, Suppl. – P. 109–117.
27. Abedin M., Tintut Y., Demer L.L. Vascular calcification. Mechanisms and clinical ramifications // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2004. – **24**. – P. 1161–1170.
28. Doherty T.M., Fitzpatrick L.A., Inoue D., Qiao J.H., Fishbein M.C., Detrano R.C., Shah P.K., Rajavashisth T.B. Molecular, endocrine, and genetic mechanisms of arterial calcification // *Endocrine Rev.* – 2004. – **25**. – P. 629–672.
29. Shao J.S., Cai J., Towler D.A. Molecular mechanisms of vascular calcification: lessons learned from the aorta // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2006. – **26**. – P. 1423–1430.

*Сум. ун-т;*

*Ін-т фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ;*

*Нац. наук. центр "Інститут кардіології імені академіка*

*М.Д. Стражеска" НАМН України, Київ*

*vikgarbuzova@yandex.ru*

*Матеріал надійшов до редакції 20.11.2010*