

УДК: 616.831-005.1/.6:548.33  
© Гарбузова В.Ю., Ткач Г.Ф., 2012

## ЧАСТОТА АРАІ ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНА РЕЦЕПТОРА ВІТАМІНУ D У ХВОРИХ З ГОСТРИМ КОРОНАРНИМ СИНДРОМОМ

Гарбузова В.Ю., Ткач Г.Ф.

*Наукова лабораторія молекулярно-генетичних досліджень, Сумський державний університет*

**Гарбузова В.Ю., Ткач Г.Ф.** Частота АраІ поліморфізму гена рецептора вітаміну D у хворих з гострим коронарним синдромом // Український морфологічний альманах. – 2012. – Том 10, № 4. – С. 19-22.

Наведені результати визначення АраІ (rs7975232) поліморфізму гена рецептора вітаміну D (VDR) у 118 хворих з гострим коронарним синдромом (ГКС) і 234 здорових індивідумів (контрольна група). Встановлено, що у хворих з ГКС співвідношення гомозигот а/а, гетерозигот і гомозигот А/А становить 28,8%, 49,2% і 22,0% (у контролі – 32,9%, 43,6% і 23,5%, P=0,559 за  $\chi^2$ -критерієм). У представників і жіночої, і чоловічої статі не виявлено статистично достовірного зв'язку між АраІ поліморфізмом гена VDR і ГКС.

**Ключові слова:** рецептор вітаміну D, поліморфізм генів, гострий коронарний синдром.

**Гарбузова В.Ю., Ткач Г.Ф.** Частота АраІ поліморфізму гена рецептора вітаміну D у больних с острым коронарным синдромом // Український морфологічний альманах. – 2012. – Том 10, № 4. – С. 19-22.

Представлены результаты определения АраІ (rs7975232) полиморфизма гена рецептора витамина D (VDR) у 118 больных с острым коронарным синдромом (ОКС) и 234 здоровых индивидуумов (контрольная группа). Установлено, что у больных с ОКС соотношение гомозигот а/а, гетерозигот и гомозигот А/А составляет 28,8%, 49,2% и 22,0% (в контроле – 32,9%, 43,6% и 23,5%, P=0,559 по  $\chi^2$ -критерию). У лиц и женского, и мужского пола не выявлено статистически значимой связи между АраІ полиморфизмом гена VDR и ОКС.

**Ключевые слова:** рецептор витамина D, полиморфизм генов, острый коронарный синдром.

**Garbuzova V.Yu., Tkach G.F.** Frequency of vitamin D receptor gene АраІ polymorphism in acute coronary syndrome patients // Український морфологічний альманах. – 2012. – Том 10, № 3. – С. 19-22.

АраІ polymorphism (rs7975232) of vitamin D receptor (VDR) gene in 118 patients with acute coronary syndrome (ACS) and in 234 healthy people was determined. It was shown that in the patients with OCS distribution of a/a homozygotes, heterozygotes and A/A homozygotes was 28,8%, 49,2%, 22,0% (in control – 32,9%, 43,6%, 23,5%, P=0,559 by  $\chi^2$ -test). In the individuals both of female and male sex any statistically significant association between the АраІ polymorphism of the VDR gene and ACS was not revealed.

**Key words:** vitamin D receptor, gene polymorphism, acute coronary syndrome.

**Вступ.** Сьогодні доведено, що кальцитріол ( $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ) відіграє важливу роль не тільки в регуляції функціональних і метаболічних процесів в організмі, а й у розвитку багатьох хвороб, у тому числі серцево-судинних [10]. У механізмах біологічної дії вітаміну D важливу роль має вплив кальцитріолу на геном клітин. Він здійснюється через VDR – представника суперсімейства ядерних рецепторів. Крім класичних "мішеней" вітаміну D, якими є кишковик і кістки, VDR виявляють у багатьох інших структурах організму, серед яких – гладкі м'язові клітини кровоносних судин [7,9]. З активацією цих рецепторів пов'язують цілий ряд ефектів, що можуть мати стосунок до здатності вітаміну D викликати дистрофічно-склеротичні зміни в судинній стінці [6,18].

З огляду на зазначене постає питання про можливу роль VDR не тільки в біологічній дії кальцитріолу, а й у патогенезі уражень серця і судин та їх тяжких наслідків, зокрема гострого коронарного синдрому. Розв'язання даної проблеми можуть слугувати молекулярно-генетичні дослідження, спрямовані на вивчення зв'язку поліморфізму гена VDR з розвитком серцево-судинних хвороб. Серед опублікованих робіт можна знайти дані про асоціацію деяких одонуклеотидних поліморфізмів VDR з ішемічною хворобою серця [12,13], кальцифікуючим стенозом аортального клапана [11], ішемічним інсультом [17]. Що стосується зв'язку

АраІ поліморфізму, з гострим коронарним синдромом, то таких даних немає, що й спонукало нас до проведення власних досліджень.

Представлену роботу виконано в рамках теми наукових досліджень з держбюджетним фінансуванням "Визначення ролі поліморфізму поодиноких нуклеотидів у розвитку склеротичних уражень кровоносних судин", № 91.01.01.11-12.

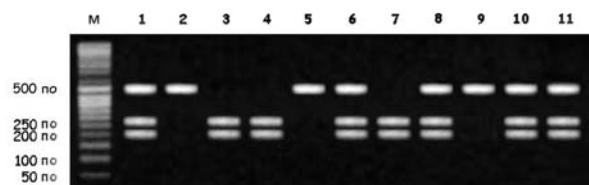
**Мета дослідження** – провести аналіз асоціації алейного поліморфізму гена VDR, АраІ, з розвитком гострого коронарного синдрому в осіб різної статі.

**Матеріал і методи.** У роботі використано венозну кров 118 хворих з ГКС (22,0% жінок і 78,0% чоловіків, середній вік –  $55,9 \pm 0,89$  років), що перебували на лікуванні у кардіологічному відділенні Сумської міської клінічної лікарні №1. Кінцевий діагноз нестабільної стенокардії (НС) виставлено у 33,5% хворих, гострого інфаркту міокарда (ІМ) – у 66,5% пацієнтів. Діагноз гострого ІМ і НС встановлено на підставі даних клінічних, електрокардіографічних і біохімічних обстежень, відповідно до рекомендацій європейського та американського товариств кардіологів [1,15]. Контрольна група складалася із 234 пацієнтів, у яких відсутність серцево-судинної патології підтверджували шляхом збирання анамнестичних даних, зняття електрокардіограми і вимірювання артеріального тиску. Контрольна група і група

група і група хворих з ГКС відрізнялися за співвідношенням осіб різної статі: серед хворих було більше чоловіків ( $P=0,034$  за  $\chi^2$ -критерієм), проте середній вік першої ( $66,0 \pm 0,95$  років) був істотно вищим, ніж другої ( $P < 0,001$ ). Остання обставина збільшувала надійність контролю, оскільки зменшувалася ймовірність розвитку ГКС у пацієнтів контрольної групи в майбутніх періодах їхнього життя.

Визначення Араї поліморфізму гена VDR (rs7975232) проводили за допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції (PCR) з наступним аналізом довжини рестрикційних фрагментів при виявленні їх шляхом електрофорезу в агарозному гелі.

Для генотипування венозну кров набирали в стерильних умовах в моновети об'ємом 2,7 мл з калієвою сіллю етилендіамінтетраоцтової кислоти ("Sarstedt", Німеччина), що слугувала антикоагулянтом. Кров заморозували і зберігали при температурі  $-20^{\circ}\text{C}$ . ДНК з неї виділяли, використовуючи набори "Изоген" (Росія). Ампліфікацію ділянки гена, що містить сайт Араї поліморфізму, проводили за допомогою пари специфічних праймерів: прямого (sense) –  $5'$ -CAGAGCATGGACAGGGA GCAA- $3'$  і зворотного (antisense) –  $5'$ -CACITCGAGCACAAGGGGCGTT AGC- $3'$ . Праймери було синтезовано фірмою "Metabion" (Німеччина). Для ампліфікації брали 50-100 нг ДНК і додавали до суміші, що містила 5 мкл 5-кратного PCR-буферу, 1,5 мМ сульфату магнію, 250 мкМ суміші чотирьох нуклеотидтрифосфатів, по 15 рМ кожного з праймерів і 0,75 ОД Таq-полімерази ("Ферментас", Литва), об'єм доводили до 25 мкл деіонізованою водою. PCR проводили в термоциклері GeneAmp PCR System 2700 ("Applied Biosystems", США). Програма ампліфікації була такою: денатурація –  $94^{\circ}\text{C}$  (50 с), гібридизація праймерів –  $64,5^{\circ}\text{C}$  (45 с), елонгація –  $72^{\circ}\text{C}$  (1 хв), разом 33 цикли. У подальшому 6 мкл продукту ампліфікації інкубували при  $37^{\circ}\text{C}$  протягом 20 годин з 5 ОД рестриктази Араї у буфері В такого складу: 10 мМ трис-НСІ (рН 7,5), 10 мМ хлориду магнію і 0,1 мг/мл альбуміну. Якщо в 59979 позиції гена VDR містився гуанін, ампліфікат, який складався з 501 пари основ, розщеплювався рестриктазою Араї на два фрагменти – 284 і 217 пар основ. У разі заміни гуаніну на тимін сайт рестрикції для Араї втрачався і утворювався один фрагмент розміром 501 пара основ (рис. 1).



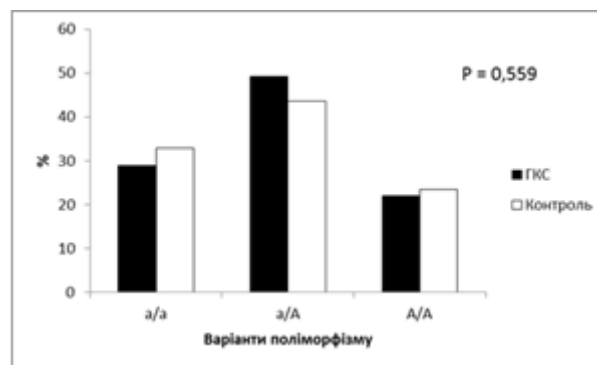
**Рис. 1.** Результати рестрикційного аналізу Араї поліморфізму гена VDR. М – маркер молекулярної маси (по - пари нуклеїнових основ); доріжки 2,5,9 відповідають А/А-генотипу; доріжки 1,6,8,10,11 – А/а-генотипу; 3,4,7 – а/а-генотипу.

Ампліфікати вивченого фрагмента гена VDR після рестрикції розділяли в 2,5% агарозному гелі, що містив бромистий етидій. Горизонтальний електрофорез ( $0,1\text{A}$ ;  $140\text{V}$ ) проводили протягом 40 хв. Візуалізацію ДНК після електрофорезу здійснювали за допомогою транслюмінатора ("Біоком", Росія).

Статистичний аналіз проводили з використанням програми SPSS-17. При цьому достовірність відмінностей визначали за  $\chi^2$ -критерієм. Величини  $P < 0,05$  вважали статистично значимими.

**Результати дослідження та їх обговорення.** Генотипування хворих з ГКС та пацієнтів контрольної групи за Араї поліморфізмом гена VDR дало змогу встановити частоту, з якою зустрічаються окремі варіанти цього гена, а також порівняти їх між групами загалом і за статтю.

На рис. 2 наведено частоту виявлення різних алейних варіантів даного поліморфізму у пацієнтів, що були об'єктом дослідження.



**Рис. 2.** Частота алейних варіантів гена VDR за поліморфізмом Араї у хворих з ГКС (чорні стовпчики) і в контрольній групі (білі стовпчики). P – статистична значимість відмінності показників за  $\chi^2$ -критерієм Пірсона

Так, встановлено, що у хворих з ГКС співвідношення гомозигот за а-алелем (a/a), гетерозигот (a/A) і гомозигот за А-алелем (A/A) складає 28,8%, 49,2% і 22,0%, а в контрольній групі – відповідно 32,9%, 43,6% і 23,5%. При цьому відмінності частоти зазначених генотипів між групою хворих з ГКС та контрольною групою були статистично недостовірними ( $P=0,559$ ).

Розподіл частот алейних варіантів поліморфізму Араї за статтю у хворих і в контролі подано в табл. 1. Як випливає з наведених даних, частота різних варіантів даного поліморфізму істотно не відрізняється у пацієнтів з ГКС та в осіб контрольної групи, якщо порівнювати окремо жінок і чоловіків.

У табл. 2 представлено дані про частоту поліморфних варіантів Араї у жінок і чоловіків у контрольній групі і у хворих з ГКС.

Одержані результати свідчать про відсутність статистично значимих відмінностей між особами жіночої і чоловічої статі як серед пацієнтів з ГКС ( $P=0,455$ ), так і в контролі ( $P=0,791$ ).

Нарешті, ще один аналіз дав підстави для висновку про те, що немає зв'язку між статтю пацієнтів і розвитком ГКС у жодній з груп, утво-

рених з урахуванням генотипу за AраI поліморфізмом гена VDR (табл. 3).

На сьогодні описано 1518 одонуклеотидних поліморфізмів (SNP) гена VDR у людини. Серед них AраI, локалізований у 8-му інтроні, недалеко від ділянки, яку позначають як 3'-UTR (untranslated region). Суть AраI SNP полягає в тому, що у положенні 59979 гуанін заміщується на тимін. Самі собою поліморфізми в інтронах не є функціонально значимим, оскільки не змінюють послідовність азотистих основ у змістовній частині гена, проте, будучи зчепленими з регуляторними ділянками гена, можуть виступати маркерами функціональ-

них зв'язків інших SNP з розвитком патологічних процесів і хвороб. Так, сьогодні встановлено, що AраI SNP тісно пов'язаний з поліморфними варіантами двох інших SNP гена VDR – BsmI (8-ий інтрон) і TaqI (9-ий екзон). Завдяки такому зчепленню серед великої кількості прогнозованих гаплотипів виявляють лише три: baT, BAa і bAT [16]. Близькість зазначених гаплотипів до 3'-UTR ділянки гена може певним чином позначатися на регуляції його експресії, оскільки відомо, що від цієї ділянки залежить стабільність мРНК, а отже, і кількість синтезованого білкового продукту.

**Таблиця 1.** Зв'язок AраI поліморфізму гена VDR з розвитком гострого коронарного синдрому (ГКС) в осіб жіночої і чоловічої статі

Стать	Генотип	Контроль	ГКС
Жінки	a/a	31,2%	19,2%
	a/A	46,8%	53,8%
	A/A	22,1%	26,9%
$\chi^2=1,381; P=0,501$			
Чоловіки	a/a	33,8%	31,5%
	a/A	42,0%	47,8%
	A/A	24,2%	20,7%
$\chi^2=0,848; P=0,655$			

**Таблиця 2.** Частота генотипів за AраI поліморфізмом гена VDR у жінок і чоловіків у контрольній групі і у хворих з ГКС

	Генотип	Жінки	Чоловіки
Контрольна група	a/a	31,2%	33,8%
	a/A	46,8%	42,0%
	A/A	22,0%	24,2%
$\chi^2=0,468; P=0,791$			
Хворі з ГКС	a/a	19,3%	31,5%
	a/A	53,8%	47,8%
	A/A	26,9%	20,7%
$\chi^2=1,574; P=0,455$			

**Таблиця 3.** Частота осіб жіночої і чоловічої статі у групах порівняння залежно від варіантів генотипу за AраI поліморфізмом гена VDR

Генотип	Стать	Контроль	ГКС
a/a	жінки	31,2%	14,7%
	чоловіки	68,8%	85,3%
$\chi^2=3,312; P=0,069$			
a/A	жінки	35,3%	24,1%
	чоловіки	64,7%	75,9%
$\chi^2=2,142; P=0,143$			
A/A	жінки	30,9%	26,9%
	чоловіки	69,1%	73,1%
$\chi^2=0,135; P=0,714$			

У проведених нами дослідженнях AраI поліморфізму було встановлено, що у контрольній групі пацієнтів частота мінорного алеля A складає 45%. Це цілком відповідає середньому показнику 44%, одержаному для багатьох європейських популяцій [16]. Для порівняння, в азійських популяціях частота цього алеля дорівнює 74%, в африканських – 31%.

Зв'язок AраI поліморфізму з різними патологічними процесами і хворобами вивчався у багатьох дослідженнях у різних популяціях. Тільки в небагатьох з них було встановлено асоціацію цього SNP з цукровим діабетом II типу

[5] і бронхіальною астмою [14]. Переважають, однак, роботи, у яких не виявлено зв'язку AраI з недугами і патологічними змінами в організмі людини. Це стосується показника мінеральної щільності кісток (BMD) [8], остеопорозу [3], патологічних переломів [2], раку передміхурової залози [4], доброякісної гіперплазії простати [4], цукрового діабету II типу [19].

У проведених нами дослідженнях не виявлено зв'язку AраI поліморфізму з гострим коронарним синдромом. Але, остаточний висновок можна буде зробити тільки після генотипування пацієнтів по двох інших, близьких до AраI SNP

– BsmI і TaqI – і аналізу асоціації ГКС з відповідними гаплотипами.

**Висновки:** У виконаній нами роботі вперше проаналізовано асоціацію Араї поліморфізму гена VDR з гострим коронарним синдромом у представників української популяції і не виявлено зв'язку досліджуваного генетичного чинника з ГКС загалом і в осіб жіночої й чоловічої статі зокрема.

**Перспективи подальших досліджень** пов'язані з вивченням впливу окремих гаплотипів за поліморфізмами гена VDR (Араї + BsmI + TaqI) на розвиток гострого коронарного синдрому.

#### ЛІТЕРАТУРА:

- Bertrand M.E., Simoons M.L., Fox K.A.A. et al. 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.
- Chatzipapas C. Polymorphisms of the Vitamin D Receptor Gene and Stress Fractures / C. Chatzipapas, S. Boikos, G.I. Drosos, K. Kazakos, et al.// *Horm Metab Res.* – 2009. – V. 41. – P. 635 – 640.
- Evaluation of the effects of vitamin D receptor and estrogen receptor 1 gene polymorphisms on bone mineral density in postmenopausal women / M.D. Tanriover, G.B. Tatar, T.D. Uluturk, D.D. Erden, A. Tanriover et al. // *Clin Rheumatol.* – 2010. – V. 29. – P.1285–1293.
- Habuchi T. Association of vitamin D receptor gene polymorphism with prostate cancer and benign prostatic hyperplasia in a Japanese population / T. Habuchi, T. Suzuki, R. Sasaki, L. Wang, et al. // *Cancer Research* – 2000. – Vol. 60. – P. 305-308.
- Hitman G.A. VDR gene polymorphism influence insulin secretion in Bangladeshi Asian / G.A. Hitman, N. Mannan, M.F. McDermott, E. Aganna, B.W. Ogunkolade, C.N. Hales, et al. // *Diabetes.* – 1998 – V. 47. P. 688-691.
- Kawashima H. 1,25-dihydroxyvitamin D3 stimulates Ca-ATPase in a vascular smooth cell line / H. Kawashima // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*– 1988.– V.150.– P. 1138-1143.
- Koh E. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 binds specifically to rat vascular smooth muscle cells and stimulates their proliferation in vitro / E. Koh, S. Morimoto, K. Fukuo // *Life Sci.*– 1988.– V.42.– P. 215-223.
- Macdonald H.M. Large-Scale Population-Based Study Shows No Evidence of Association Between Common Polymorphism of the VDR Gene and BMD in British Women / H.M. Macdonald, F.E. McGuigan, A. Stewart, A.J. Black, et al. // *Journal of Bone and Mineral Reseach.* – V. 21, N. 1. – 2006 – P.151 – 162.
- Merke J. Demonstration of 1,25 (OH)<sub>2</sub> vitamin D3 receptors and actions in vascular smooth cells in vitro / J. Merke, W. Hofmann, D. Goldschmidt // *Calcified Tissue Int.*– 1987.– V.41.– P. 112-114.
- Norman P.E. Vitamin D, shedding light on the development of disease in peripheral arteries / P.E. Norman, J.T. Powell // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*- 2005.- V.25.- P. 39-46.
- Ortlepp J.R. The vitamin D receptor genotype predisposes to the development of calcific aortic valve stenosis / J.R. Ortlepp, R. Hoffmann, F. Ohme, J. Lauscher, et al. // *Heart.*- 2001.- V.85.- P. 635-638.
- Pan X.M. No association between vitamin D receptor polymorphisms and coronary artery disease in a Chinese population / X.M. Pan, D.R. Li, L. Yang, E.Y. Wang et al. // *DNA Cell Biol.* – 2009. – V. 28. – P. 521-525.
- Poirier O. Lack of association between Vitamin D receptor polymorphisms and coronary artery disease in the ECTIM Study / O. Poirier, S. Herrmann, V. Nicaud, G. Luc // *Gene Canvas - Short report published 09/2003*,  
14. [http://genecanvas.ecgene.net/readarticle.php?article\\_id=15](http://genecanvas.ecgene.net/readarticle.php?article_id=15)
- Saadi A. Association study between vitamin D receptor gene polymorphisms and asthma in the chinese han population: a case-control study / A. Saadi, G. Guimin, L. Huaichen, W. Chunhua et al. // *BMC Medical Genetics.* – 21 July 2009 – V. 10:71 <http://www.biomedcentral.com/1471-2350/10/71>
- Thygesen K, Alpert J., White H. et al. Universal definition of myocardial infarction // *European Heart J.*-2007.-28.-P.2525-2538.
- Uitterlinden A.G. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms / A.G. Uitterlinden, Y. Fang, J.B.J. van Meurs, H.A.P. Pols, J.P.T.M. van Leeuwen // *Gene.*– 2004.– V. 338.– P. 143-156.
- Wang X. A meta-analysis of candidate gene polymorphisms and ischemic stroke in 6 study populations: association of lymphotoxin-alpha in nonhypertensive patients / X. Wang, S. Cheng, V.H. Brophy, H.A Erlich. // *Stroke.*– 2009.– V. 40(3).– P. 683-695.
- Wu-Wong J.R. Effects of Vitamin D analogs on gene expression profiling in human coronary artery smooth muscle cells / J.R. Wu-Wong, M. Nakane, J. Ma, X. Ruan, P.E. Kroeger // *Atherosclerosis.*– 2006.– V.186.– P. 20-28.
- Ye W. VDR gene polymorphisms are associated with obesity in type 2 diabetic subjects with early age of onset / W. Ye, A.F. Reis, D. Dubois-Laforgue, C. Bellanne-Chantelot, J. Timsit, G. Velho // *Euro J. Endocrinol.* – 2001. – Vol. 145. – P. 181-186.

Надійшло: 13.09.2012 р.  
Рецензент: проф. В.І.Лузін