

## **АНАЛІЗ АСОЦІАЦІЇ T-138C ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНА МАТРИКСНОГО GLA-ПРОТЕЇНУ З ІШЕМІЧНИМ АТЕРОТРОМБОТИЧНИМ ІНСУЛЬТОМ В ОСІБ З НОРМАЛЬНИМ І ПІДВИЩЕНИМ АРТЕРІАЛЬНИМ ТИСКОМ**

**Сумський державний університет (м. Суми)**

Представлену роботу виконано в рамках теми наукових досліджень з держбюджетним фінансуванням «Визначення ролі поліморфізму поодиноких нуклеотидів у розвитку склеротичних уражень кровеносних судин», № держ.реєстрації 91.01.01.11-12.

**Вступ.** Спадкові чинники цереброваскулярної патології привертають до себе все більшу увагу, оскільки існують численні докази генетичної зумовленості цілого ряду механізмів, причетних до уражень кровеносних судин. Сьогодні в багатьох лабораторіях і клініках ведеться пошук зв'язків між одонуклеотидним поліморфізмом великої кількості генів і розвитком патологічних процесів та хвороб головного мозку. Об'єктом дослідження стали групи генів, пов'язані з різними патогенетичними механізмами розладів мозкового кровообігу та інсультів, до яких відносять порушення системи гемостазу, розвиток запалення і дисліпопротеїнемії як складових частин атеросклеротичного процесу, зміни метаболізму жирової тканини, відхилення в реакціях вазоконстрикції та вазодилатації, посилену функціональну активність ренін-ангіотензинової системи, порушення водно-електролітного обміну тощо [3].

До генів, що можуть впливати на розвиток деяких ускладнень атеросклерозу (кальцифікація бляшок, порушення їх стабільності, тромбоутворення) відносять і ген матриксного GlA-протеїну (MGP) – білка, що є потужним антикальциногенним чинником, який запобігає ектопічній мінералізації, а отже, і розвитку кальцифікації артерій [16, 17]. Остання може виявляти себе обвапненням середнього шару судинної стінки (артеріосклероз Менкеберга) і (або) відкладанням солей кальцію в атероматозні бляшки [1, 10, 12, 13].

Є численні дані про те, що кальцифікація артерій – це погана прогностична ознака щодо розвитку тяжких судинних наслідків – інфаркту міокарда, ішемічних інсультів [15, 21]. А тому пошук чинників, які впливають на мінералізацію структур судинної стінки і на пов'язані з цим процесом механізми, вважається сьогодні актуальним завданням.

Одним з важливих факторів ризику атеросклеротичного процесу і наслідків кальцифікації артерій є артеріальна гіпертензія, у патогенезі якої значне місце посідає спадкова схильність, зумовлена одонуклеотидним поліморфізмом багатьох генів [6, 9, 18, 20]. У списку ще не досліджених генів-кандидатів, що можуть мати стосунок до механізмів

підвищення артеріального тиску і наслідків артеріальної гіпертензії, зокрема інсультів, перебуває і ген MGP. Саме це спонукало нас до вивчення асоціації поліморфізму цього гена з розвитком ішемічного інсульту та відомими факторами ризику гострих порушень мозкового кровообігу.

**Мета дослідження** – провести аналіз асоціації одного з алельних поліморфізмів гена MGP, T-138C, з розвитком ішемічного атеротромботичного інсульту (ІАТІ) в осіб з нормальним і підвищеним артеріальним тиском.

**Об'єкт і методи дослідження.** У роботі використано венозну кров 170 хворих з ІАТІ (42,4% жінок і 57,6% чоловіків) віком від 40 до 85 років (середній вік – 64,7±0,73 роки), що перебували на диспансерному обліку в поліклінічному відділенні Сумської міської клінічної лікарні №5.

Ішемічний характер інсульту встановлювався за даними анамнезу і клінічної картини хвороби, даних МРТ-дослідження головного мозку. Патогенетичний варіант інсульту визначали відповідно до критеріїв TOAST [4], на підставі анамнестичних даних і особливостей клінічного перебігу хвороби, даних ультразвукової доплерографії магістральних артерій голови, ЕКГ.

Контрольна група складалася зі 124 пацієнтів, у яких відсутність ІАТІ підтверджували шляхом збирання анамнестичних даних і проведення загальноприйнятих неврологічних досліджень. Контрольна група і група хворих з ІАТІ не відрізнялися за співвідношенням осіб різної статі ( $P=0,294$  за  $\chi^2$ -критерієм), однак середній вік першої (76,7±0,93 роки) був істотно вищим, ніж другої ( $P < 0,001$ ).

Визначення T-138C (rs1800802) поліморфізму гена MGP проводили за допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції з наступним аналізом довжини рестрикційних фрагментів при виділенні їх шляхом електрофорезу в агарозному гелі.

Деталі методики генотипування описано в одній з попередніх наших публікацій [2]. Статистичний аналіз проводили з використанням програми SPSS-17. Дані клінічних досліджень перевірялися на нормальний розподіл за допомогою тесту Шапіро-Вілка. Достовірність відмінностей середніх величин у групах з різними генотипами визначалася за допомогою методики однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA), а номінальних змінних – за  $\chi^2$  Пірсона. Значення  $P < 0,05$  вважали достовірним.

**Результати досліджень та їх обговорення.**

Генотипування хворих з ІАТІ та пацієнтів контрольної групи за T-138С поліморфізмом гена MGP дало змогу встановити частоту, з якою зустрічаються окремі варіанти цього гена, а також порівняти її між групами загалом, а також за наявністю чи відсутністю у пацієнтів артеріальної гіпертензії.

Так, було встановлено, що у хворих з ІАТІ співвідношення гомозигот за основним алелем (Т/Т), гетерозигот (Т/С) і гомозигот за мінорним алелем (С/С) складає 61,2%, 31,2% і 7,6%, а в контрольній групі – відповідно 59,7%, 35,6%, 4,8%. При цьому відмінності частоти зазначених генотипів між групою хворих з ІАТІ та контрольною групою були статистично недостовірними (P > 0,05).

В табл. 1 наведено дані про величини артеріального тиску (АТ) у хворих з ІАТІ і у пацієнтів контрольної групи залежно від їхнього генотипу за T-138С поліморфізмом гена MGP.

**Таблиця 1**

**Артеріальний тиск (АТ) у хворих з ішемічним інсультом і у пацієнтів контрольної групи залежно від генотипів за поліморфізмом T-138С гена MGP (мм рт. ст.) (M ± m)**

	Т/Т	Т/С	С/С	Р
Хворі з інсультом				
n	104	53	13	
Систолічний АТ	168,0±2,94	164,6±3,62	168,5±9,78	0,780
Діастолічний АТ	96,3±1,68	94,2±1,76	93,1±3,82	0,628
Пульсовий АТ	71,7±2,12	70,5±2,80	75,4±6,76	0,758
Середній АТ	120,2±1,94	117,6±2,16	118,2±5,62	0,711
Контрольна група				
n	72	43	6	
Систолічний АТ	154,3±2,82	148,8±3,49	160,0±7,75	0,354
Діастолічний АТ	86,6±1,55	85,5±1,77	90,0±6,33	0,686
Пульсовий АТ	67,8±2,14	63,4±2,77	70,0±6,33	0,399
Середній АТ	109,1±1,80	106,6±2,11	113,3±3,94	0,467

**Примітка:** n – кількість пацієнтів, P – статистична значимість відмінностей середніх величин.

Як впливає з результатів дослідження, відмінності між середніми величинами всіх видів АТ (систоличного, діастолічного, пульсового і середнього) були недостовірними як у контрольній групі, так і у хворих з ІАТІ (P>0,05).

При поділі пацієнтів на тих, що мають нормальний АТ, і тих, у кого виявлено артеріальну гіпертензію (систоличний АТ > 140 мм рт. ст., діастолічний АТ > 90 мм рт. ст.), порівняння частоти досліджуваних генотипів дало такі результати (табл. 2).

**Таблиця 2**

**Частота генотипів за T-138С поліморфізмом гена MGP у пацієнтів з нормальним артеріальним тиском (НАТ) і артеріальною гіпертензією (АГ) у контрольній групі і в хворих з ішемічним інсультом**

Генотип	Контроль		Інсульт	
	НАТ	АГ	НАТ	АГ
Т/Т	27 (56,2%)	45 (61,6%)	25 (59,5%)	79 (61,7%)
Т/С	19 (39,6%)	24 (32,9%)	13 (31,0%)	40 (31,3%)
С/С	2 (4,2%)	4 (5,5%)	4 (9,5%)	9 (7,0%)
Разом	48 (100%)	73 (100%)	42 (100%)	128 (100%)
P (НАТ-АГ)	0,738		0,868	
P (НАТ-АТ)	0,478			
P (АГ-АГ)	0,870			

**Примітка:** P – статистична значимість відмінностей за  $\chi^2$ -критерієм. Групи порівняння показано в дужках.

Як у контрольній групі, так і у хворих з ІАТІ, розподіл трьох можливих варіантів генотипу за T-138С поліморфізмом гена MGP не відрізнявся у пацієнтів з артеріальною гіпертензією і в осіб з нормальним АТ. Не виявлено відмінностей і при порівнянні хворих з ІАТІ та пацієнтів контрольної групи, що мали як нормальний АТ (P=0,478), так і артеріальну гіпертензію (P=0,870).

Суть одонуклеотидного поліморфізму T-138С полягає в тому, що в ділянці промотора гена MGP, у сайті -138, азотиста основа тимін заміщена на цитозин. Унаслідок цього цілком можливо є зміна функціональних властивостей промотора, що може виявляти себе підвищенням або пригніченням транскрипції гена MGP, а в кінцевому підсумку і його експресії, у відповідь на ті чи ті регуляторні впливи.

У який спосіб зміни промотора впливають на діяльність гена – проблема, до розв'язання якої намагаються підійти сьогодні, використовуючи введення в культивовані клітини генетичних конструкцій, що містять «нормальний» і «патологічний» варіанти промотора MGP та ген люциферази (люциферазний тест). Перше таке дослідження було проведено Herrmann et al. [11]. Автори показали, що активність промотора з мінорним алелем -138С (патологічний варіант), при порівнянні з -138Т (нормальним варіантом), була менша на 20% у гладких м'язових клітинах (ГМК) судин щура і на 50% у культивованих фібробластах людини.

Зовсім інші дані було отримано у дослідженні Farzaneh et al. [8]. Автори встановили, що промотори з поліморфізмом T-138С істотно змінюють транскрипційну активність гена MGP в судинних ГМК щурів in vitro. Так, варіант промотора з мінорним алелем -138С був у 4 рази активніший за основний варіант -138Т. Аналіз промотора гена MGP показав, що поліморфізм T-138С 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-138C* змінюється зв'язування цієї ділянки промотора з комплексом *AP-1*. Варіант промотора 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 промотора з алелем *-138C* є дуже низькою.

Наведені вище дані підтверджуються роботою Kobayashi et al. [14], у якій встановлено, що активність *-138T* варіанту промотора гена *MGP* істотно вища, ніж *-138C*. На думку авторів, це зумовлено різною здатністю цих двох варіантів зв'язуватися з *AP-1* комплексами.

Таким чином, неоднозначні дані щодо впливу *T-138C* поліморфізму гена *MGP* на його транскрипційну активність свідчать про складність проблеми і зумовлюють необхідність продовжувати дослідження в цьому напрямі.

До цього часу вивчення асоціації поліморфізмів гена *MGP* з розвитком серцево-судинної патології обмежувалося дослідженнями гострого коронарного синдрому і пов'язаного з ним інфаркту міокарда

[5, 7, 19]. Нами вперше проведено аналіз зв'язку онуклеотидного поліморфізму *T-138C* з ІАТІ і встановлено, що в українській популяції цей поліморфізм не є асоційованим з даним варіантом ішемічного інсульту, якщо аналіз проводити з урахуванням такого фактора ризику як артеріальна гіпертензія. Проте існування інших факторів ризику ішемічних інсультів зумовлює доцільність продовження досліджень у даному напрямі.

**Висновки.** Не виявлено зв'язку між *T-138C* поліморфізмом промотора гена *MGP* і розвитком ішемічного атеротромботичного інсульту в осіб з нормальним і підвищеним артеріальним тиском. В українській популяції цей варіант поліморфізму не асоційований з артеріальною гіпертензією як фактором ризику інсультів.

**Перспективи подальших досліджень** полягають у продовженні дослідження різних варіантів алельного поліморфізму гена *MGP* з урахуванням інших факторів ризику ішемічних інсультів, зокрема порушень ліпопротеїнового складу плазми крові і змін у системі гемостазу.

### Список літератури

1. Гарбузова В.Ю. Матриксний Gla-протеїн (MGP) та його роль в кальцифікації судинної стінки / Гарбузова В.Ю., Атаман О.В. // Фізіол. ж.– 2011.– Т. 57, №4.– С. 96-112.
2. Гарбузова В.Ю. Частота алельних варіантів гена матриксного Gla-протеїну (MGP) у хворих з гострим коронарним синдромом / Гарбузова В.Ю., Гур'янова В.Л., Пархоменко А.Н., Досенко В.Є., Атаман О.В. // Фізіол. ж.– 2011.– Т. 57, №3 – С. 16-24.
3. Торшин И.Ю. Гены и цереброваскулярная патология (гены и нуклеотидные полиморфизмы при отдельных видах физиологических сдвигов и патологических процессов) / Торшин И.Ю., Громова О.А., Никонов А.А. // Журн. неврол. психиатр.– 2009.– Т. 109, №5.– С. 77-85.
4. Adams H.P. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment / Adams H.P., Bendixen B.H., Kappelle L.J., Biller J., Love B.B., Gordon D.L., Marsh E.E. // Stroke.– 1993.– V.24.– P. 35-41.
5. Brancaccio D. Matrix GLA protein gene polymorphisms: clinical correlates and cardiovascular mortality in chronic kidney disease patients / Brancaccio D., Biondi M.L., Gallieni M., Turri O., Galassi A., Cecchini F., Russo D., Andreucci V., Cozzolino M. // Am. J. Nephrol.– 2005.– V. 25.– P. 548-552.
6. Butler M.G. Genetics of hypertension. Current status / Butler M.G. // J. Med. Liban.– 2010.–V. 58.– P. 175-178.
7. Crosier M.D. Matrix Gla protein polymorphisms are associated with coronary artery calcification / Crosier M.D., Booth S.L., Peter I., Dawson-Hughes B., Price P.A., O'Donnell C.J., Hoffmann U., Williamson M.K., Ordovas J.M. // J. Nutr. Sci. Vitaminol.– 2009.– V. 55.– P. 59-65.
8. Farzaneh-Far A. Polymorphism of the human matrix  $\gamma$ -carboxyglutamic acid protein promoter alters binding of an activating protein-1 complex and is associated with altered transcription and serum levels / 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., Shanaham C.M. // J. Biol. Chem.– 2001.– V. 276.– P. 32466-32473.
9. Garcia E.A. Genes and hypertension / Garcia E.A., Newhouse S., Caulfield M.J., Munroe P.B. // Curr. Pharm. Des.– 2003.– V. 9.– P. 1679-1689.
10. Guzman R.J. Clinical, cellular, and molecular aspects of arterial calcification / Guzman R.J. // J. Vasc. Surg.– 2007.– V. 45 (Suppl A).– P. A57-A63.
11. Herrmann S.M. Polymorphisms of the human matrix Gla protein (MGP) gene, vascular calcification, and myocardial infarction / Herrmann S.M., Whatling C., Brand E., Nikaud V., Garipey J., Simon A., Evans A., Ruidavets L.B., Arveiler D., Luc G., Tiret L., Henney A., Cambien F. // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.– 2000.– V. 20.– P. 2386-2393.
12. Jayalath R.W. Aortic calcification / Jayalath R.W., Mangan S.H., Golledge J. // Eur. J. Endovasc. Surg.– 2005.– V. 30.– P. 476-488.
13. Johnson R.C. Vascular calcification. Pathobiological mechanisms and clinical implications / Johnson R.C., Leopold J.A., Loscalzo J. // Circ. Res.– 2006.– V.99.– P. 1044-1059.
14. Kobayashi N. T-138C polymorphism of matrix Gla protein promoter alters its expression but is not directly associated with atherosclerotic vascular calcification / Kobayashi N., Kitazawa R., Maeda S., Schurgers L.J., Kitazawa S. // Kobe J. Med. Sci.– 2004.– V. 50.– P. 69-81.
15. Lehto S. Medial artery calcification. A neglected harbinger of cardiovascular complications in non-insulin-dependent diabetes mellitus / Lehto S., Niskanen L., Suhonen M., Rynnemaa T., Laasko M. // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.– 1996.– 16.– P. 978-988.

16. Price P.A. Warfarin-induced artery calcification is accelerated by growth and vitamin D / Price P.A., Faus S.A., Williamson M.K. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2000. – V. 20. – P. 317-327.
17. Proudfoot D. Molecular mechanisms mediating vascular calcification: role of matrix Gla protein / Proudfoot D., Shanahan C.M. // *Nephrology (Carlton)*. – 2006. – V. 11. – P. 455-461.
18. Ruppert V. Genetics of human hypertension / Ruppert V., Maisch B. // *Herz*. – 2003. – V. 28. – P. 655-662.
19. Taylor B.C. Matrix Gla protein and osteopontin genetic associations with coronary artery calcification and bone density: the CARDIA study / Taylor B.C., Schreiner P.J., Doherty T.M., Fornage M., Carr J.J., Sidney S. // *Hum. Genet.* – 2005. – V. 116. – P. 525-528.
20. Timberlake D.S. Molecular genetics of essential hypertension: recent results and emerging strategies / Timberlake D.S., O'Connor D.T., Parmer R.J. // *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* – 2001. – V. 10. – P. 71-79.
21. Wayhs R. High coronary artery calcium scores pose an extremely elevated risk for hard events / Wayhs R., Zelinger A., Raggi P. // *J. Am. Col. Card.* – 2002. – 39. – P. 225-230.

УДК 616.831-005.1/.6:548.33

### **АНАЛИЗ АССОЦІАЦІЇ Т-138С ПОЛІМОРФІЗМА ГЕНА МАТРИКСНОГО GLA-ПРОТЕІНА С ІШЕМІЧЕСКИМ АТЕРОТРОМБОТИЧЕСКИМ ІНСУЛЬТОМ В ОСОБЕЙ С НОРМАЛЬНИМ І ПОВЫШЕНИМ АРТЕРІАЛЬНИМ ДАВЛЕНИЕМ**

**Гарбузова В.Ю., Атаман Ю.А., Дубовик Е.И., Атаман А.В.**

**Резюме.** Представлены результаты определения Т-138С (rs1800802) полиморфизма гена матриксного Gla-протеина (MGP) у 170 больных с ишемическим атеротромботическим инсультом (ИАТИ) и 124 пациентов контрольной группы. Установлено, что у больных с ИАТИ соотношение гомозигот по основному аллелю (Т/Т), гетерозигот (Т/С) и гомозигот по минорному аллелю (С/С) составляет 61,2%, 31,2% и 7,6% (в контроле – 59,7%, 35,6%, 4,8%,  $P=0,521$  по  $\chi^2$ -критерию). Не выявлено отличий в распределении генотипов у пациентов с нормальным и повышенным артериальным давлением как у больных с инсультом, так и в особой контрольной группы.

**Ключевые слова:** матриксный Gla-протеин, полиморфизм генов, ишемический инсульт.

УДК 616.831-005.1/.6:548.33

### **АНАЛІЗ АСОЦІАЦІЇ Т-138С ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНА МАТРИКСНОГО GLA-ПРОТЕЇНУ З ІШЕМІЧНИМ АТЕРОТРОМБОТИЧНИМ ІНСУЛЬТОМ В ОСІБ З НОРМАЛЬНИМ І ПІДВИЩЕНИМ АРТЕРІАЛЬНИМ ТИСКОМ**

**Гарбузова В.Ю., Атаман Ю.О., Дубовик Є.І., Атаман О.В.**

**Резюме.** Наведені результати визначення Т-138С (rs1800802) поліморфізму гена матриксного Gla-протеїну (MGP) у 170 хворих з ішемічним атеротромботичним інсультом (ІАТІ) і 124 пацієнтів контрольної групи. Встановлено, що у хворих з ІАТІ співвідношення гомозигот за основним алелем (Т/Т), гетерозигот (Т/С) і гомозигот за мінорним алелем (С/С) становить 61,2%, 31,2% і 7,6% (у контролі – 59,7%, 35,6%, 4,8%,  $P=0,521$  за  $\chi^2$ -критерієм). Не виявлено відмінностей у розподілі генотипів у пацієнтів з нормальним і підвищеним артеріальним тиском як у хворих з інсультом, так і в осіб контрольної групи.

**Ключові слова:** матриксний Gla-протеїн, поліморфізм генів, ішемічний інсульт.

UDC 616.831-005.1/.6:548.33

### **Analysis Of The Association Between T-138C Polymorphism Of Matrix Gla-Protein Gene And Ischemic Atherothrombotic Stroke In Individuals With Normal And High Blood Pressure**

**Garbuzova V.Yu., Ataman Y.A., Dubovyk Ye.I., Ataman A.V.**

**Summary.** T-138C polymorphism (rs1800802) of matrix Gla protein (MGP) gene in 170 patients with ischemic atherothrombotic stroke and in 124 persons of the control group was determined. It was shown that in patients with stroke interrelation of main homozygotes (T/T), heterozygotes (T/C) and minor homozygotes (C/C) is 61,2%, 31,2%, 7,6% (in control – 59,7%, 35,6%, 4,8%,  $P=0,521$  by  $\chi^2$ -test). No differences in the distribution of genotypes in patients with normal and high pressure were identified neither in persons with stroke not in individuals of the control group.

**Key words:** matrix Gla protein, gene polymorphism, ischemic stroke.

Стаття надійшла 20.03.2012 р.

Рецензент – проф. Олійник С.А.